

**REBECA SANTOS MARQUES DE CARVALHO**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA BAICALEÍNA NO  
SNC E ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE  
TIPO-ANSIOLÍTICA DE FLAVONAS RELACIONADAS**

**Florianópolis  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**REBECA SANTOS MARQUES DE CARVALHO**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA BAICALEÍNA NO  
SNC E ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE  
TIPO-ANSIOLÍTICA DE FLAVONAS RELACIONADAS**

**Tese de Doutorado apresentada ao  
Curso de Pós-graduação em  
Farmacologia da Universidade  
Federal de Santa Catarina, como  
requisito parcial à obtenção do título  
de Doutor em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thereza  
Christina Monteiro de Lima**

**Florianópolis  
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

C331c Carvalho, Rebeca Santos Marques de  
Caracterização da atividade da baicaleína no SNC e estudo  
da relação estrutura-atividade tipo-ansiolítica de flavonas  
relacionadas [tese] / Rebeca Santos Marques de Carvalho ;  
orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima. -  
Florianópolis, SC, 2011.  
150 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiolíticos. 3. Flavonóides. I. Lima,  
Thereza Christina Monteiro de. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.  
III. Título.

CDU 615

**Caracterização da atividade da Baicalina no SNC e estudo  
da relação estrutura-atividade tipo-ansiolítica de flavonas  
relacionadas**

**REBECA SANTOS MARQUES DE CARVALHO**

Tese julgada e aprovada em sua forma final  
pelos membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores Doutores:



**Thereza Christina M. de Lima**  
Presidente (FMC/UFSC)



**Fabian Fagundes da Rocha**  
(DCF-IBUFRRJ)



**Márcia Maria de Souza**  
(CCS/UNIVALI)



**Flávio Henrique Reginaldo**  
(CFE/UFSC)



**Carlos Rogério Tonussi**  
(FMC/UFSC)



**Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez**  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 15 de Março de 2011.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização desta tese.

Em especial:

Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima pela oportunidade, confiança, apoio e ensinamentos em 8 anos de convivência no Laboratório de Neurofarmacologia;

Dr. Eloir Paulo Schenkel e Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner pelo grande auxílio durante os estudos de estrutura-atividade;

Dra. Mariel Marder pela realização dos estudos de *binding*;

Dr. Filipe Silveira Duarte pelos treinamentos iniciais na área comportamental e ensinamentos na pesquisa;

Dr. Jamil Assreuy, Dr. Reinaldo Naoto Takahashi e Dr. José Marino Neto; pelo exemplo como professores;

Ao Dr. Fábio Fagundes da Rocha, Dra. Márcia Maria de Souza, Dr. Flávio Henrique Reginatto, Dr. Carlos Rogério Tonussi e Dr. Anicleto Poli, membros da banca, por contribuir com a forma final deste trabalho;

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, por compor este Curso de Pós-graduação;

Às secretárias Diana Lenzi e Rita Maria por estarem sempre disponíveis para auxiliar o departamento e os alunos;

À equipe dos Biotérios Central e Setorial, em particular M.Sc. Marco Antônio Lorenzo, Joanésia, Pedro, Murilo e Redna pelos cuidados com os animais da Universidade e do Departamento;

À equipe do Laboratório de Neurofarmacologia: Dra. Lúgia Moreiras Sena, Dr. Marcelo Duzzioni, M.Sc. Alexandre Ademar Hoeller, M.Sc. Cristiane Felisbino Silva, M.Sc. Gilliard Lach, M.Sc. Andressa Gazola, M.Sc. Evelyn Cristina Silva Santos, Bióloga Ana Paula Ramos Costa, e aos graduandos em Farmácia Nayana Moreira Silva e Leandro Rinaldi Leme, pelos ensinamentos, auxílio e momentos de descontração no laboratório .

Às instituições de fomento à pesquisa, particularmente à CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro ao laboratório e aos alunos, na forma de bolsas, que permitem a dedicação integral à pesquisa;

Ao amigo Médico Veterinário David Farias Pinheiro Júnior pelo auxílio constante no cuidado dos nossos pacientes carentes e dos meus animais, possibilitando dispendir mais atenção e tempo para a pesquisa;

À minha grande família: Wanja, Raquel e Frederico Santos Marques de Carvalho, Marcelo Takeshi Yamashita, Analice Moraes Vieira, Theodoro e Marina; pelo apoio emocional e financeiro, sem o qual não poderia me dedicar à pós-graduação;

À minha pequena família: Sérgio Ramos, Java, Laika, Mila, Mel e Cleópatra, pelo apoio e companhia constante.

E, por último, mas não menos importante, aos camundongos que cedem suas vidas para que a Ciência possa progredir e salvar outras tantas vidas humanas e animais.

*“O que eu faço é uma gota no meio de um oceano, mas sem ela o  
oceano será menor.”*  
*Madre Tereza de Calcutá*

## RESUMO

### **Caracterização da atividade da baicaleína no SNC e estudo da relação estrutura-atividade tipo-ansiolítica de flavonas relacionadas**

Os flavonoides são compostos polifenólicos largamente encontrados no reino vegetal, apresentando uma série de propriedades farmacológicas. No sistema nervoso central (SNC) alguns exercem efeitos sedativos e ansiolíticos. O presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da administração central do flavonoide baicaleína (BC) no comportamento de camundongos, bem como traçar um estudo da relação estrutura-atividade entre vários flavonoides estruturalmente relacionados. Camundongos Swiss adultos fêmeas foram tratados por via intracerebroventricular (i.c.v.) com BC (20-0,002 pmol) e 5 min após, submetidos a diferentes testes comportamentais: sono induzido por éter etílico (SE), labirinto em cruz elevado (LCE), placa perfurada (PP), convulsões induzidas por pentilenotetrazol (CPTZ), e teste de suspensão pela cauda (TST); para identificar possíveis atividades sedativa, tipo-ansiolítica, anticonvulsivante ou tipo-antidepressiva, respectivamente. O tratamento com BC potencializou o sono etéreo e promoveu efeito tipo-ansiolítico, mas não anticonvulsivante ou do tipo antidepressivo, nas concentrações de 0,02 e 0,2 pmol, independente de qualquer interferência metabólica sistêmica. Os pré-tratamentos com flumazenil (FMZ), antagonista benzodiazepínico, e dl-p-clorofenilalanina etiléster (PCPA), depletor de serotonina, não modificaram significativamente os efeitos sedativos (FMZ) ou tipo-ansiolítico (FMZ e PCPA) da BC, embora tenham atenuado alguns parâmetros comportamentais observados no LCE. Concentrações subefetivas de BC mostraram efeito sinérgico ao diazepam (DZP) no teste do LCE. Seu efeito tipo-ansilfótico parece dependente de sua atividade nos receptores gabaérgicos do tipo GABA<sub>A</sub> e modulados pelo sítio do



pentilenotetrazol (PTZ) e do neuroesteroide dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), os quais antagonizaram seu efeito do tipo-ansiolítico. Face aos nossos resultados, sugerimos que a BC é capaz de promover um efeito tipo-ansiolítico e sedativo quando administrada centralmente, sendo o primeiro efeito parcialmente dependente do sistema GABAérgico, mas não do sistema serotoninérgico, embora a serotonina possa estar envolvida no seu efeito motor. Além disso, no estudo de estrutura-atividade mostramos o potencial terapêutico para os flavonoides estruturalmente relacionados à BC. Os flavonoides 7,8-dihidroxiavona (7,8-DH); 6-hidroxiavona (6-H); 6-metoxiavona (6-M); 5,7-dihidroxiavona (5,7-DH); 6,7-dihidroxiavona (6,7-DH); 7-hidroxiavona (7-H); apigenina (4',5,7-trihidroxiavona) (AP); quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiavona) (QC); luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiavona) (LT), promoveram efeitos tipo-ansiolíticos. A galangina (3,5,7-trihidroxiavona) (GL), no entanto, não promoveu esse efeito, mostrando haver uma correlação entre efeito tipo-ansiolítico e a ligação ao sítio benzodiazepínico, embora esse fato não possa explicar completamente o efeito encontrado para todos os flavonoides testados. Os resultados corroboram outros trabalhos acerca dos efeitos centrais produzidos pela avona BC e flavonoides a ela relacionados, mostrando seu potencial farmacológico para o tratamento de distúrbios de ansiedade.

## ABSTRACT

### **Neuropharmacological characterization of baicalein and study of the structure-activity relationship of related flavones**

Flavonoids are polyphenolic compounds widely found in vegetables that present several pharmacological properties. In the central nervous system some of them exert sedative and anxiolytic-like effects. In the present work we have studied the effects of the central administration of the flavonoid baicalein (BC) in the behavior of mice. We also studied the structure-activity relationship of other flavonoids structurally related to BC. Adult mice were treated by intracerebroventricular route (i.c.v.) and, after 5 min, submitted to several validated experimental models such as the ether-induced sleeping (SE), elevated plus-maze (LCE), hole board (PP), pentylenetetrazol-induced convulsions (CPTZ) and the tail suspension tests (TST) to evaluate the putative sedative, anxiolytic, anticonvulsant and antidepressant-like effects. BC potentiated the ether induced-sleep and showed an anxiolytic-like effect in the LCE (0.02 and 0.2 pmol), regardless of a systemic metabolic route, without affecting the pentylenetetrazol-induced convulsions or the tail suspension test immobilization. Pretreatment with flumazenil (FMZ), a benzodiazepine antagonist, or (dl-p-chlorophenylalanine ethyl ester) PCPA, which depletes serotonin, did not clearly modify the anxiolytic-like (FMZ or PCPA) or sedative effect (FMZ) of BC, although both had attenuated some behavioral parameters observed in the elevated plus-maze. Subeffective doses of BC were able to show a synergic effect with diazepam (DZP) on the LCE. Its anxiolytic-like effect seems to be dependent of the GABAergic receptors and modulated by pentylenetetrazole's and neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate's (DHEAS) sites since they antagonize the BC's anxiolytic-like effect. Altogether these findings pointed that BC is able to promote

anxiolytic-like and sedative effects when given by i.c.v. route that are, at least in part, dependent on GABAergic but not of the 5-HT system, although 5-HT seems to be involved on BC's motor effects. Moreover, the structure-activity relationship showed the therapeutic potential of related flavonoids: 7,8-dihydroxyflavone; 6-hydroxyflavone; 6-methoxyflavone; 5,7-dihydroxyflavone; 6,7-dihydroxyflavone; 7-hydroxyflavone; apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone); quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone); luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), with anxiolytic-like effect, and only galangin (3,5,7-trihydroxyflavone) has no effect in this test. These results indicate a relationship between the anxiolytic-like effect and the affinity to the benzodiazepine receptor, although other systems could be underlying the observed effects for all flavonoids here tested. Our results are in accordance with others about the central effects of BC and some of its related flavonoids and we have shown the therapeutic potential to several flavonoids for treating anxiety disorders.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura geral dos flavonoides, com seus núcleos A, B, e C	20
<b>Figura 2</b> - Principais classes de flavonoides	22
<b>Figura 3</b> - Estrutura da flavona baicaleína	24
<b>Figura 4</b> - Estrutura orto, meta e para, relativa à posição de substituintes num anel benzênico	27
<b>Figura 5</b> - Duração do sono induzido por éter etílico em camundongos, após a administração de BC no teste da hipnose induzida por éter etílico	55
<b>Figura 6</b> - Efeito do tratamento de camundongos com a BC no teste do labirinto em cruz elevado	57
<b>Figura 7</b> - Efeito do tratamento de camundongos com a BC no teste do labirinto em cruz elevado	58
<b>Figura 8</b> - Efeito do tratamento de camundongos com a BC no teste da placa perfurada	60
<b>Figura 9</b> - Influência do pré-tratamento com FMZ nos efeitos induzidos pela administração central de BC e de DZP (entradas e tempo nos braços abertos) no labirinto em cruz elevado	65
<b>Figura 10</b> - Influência do pré-tratamento com FMZ nos efeitos induzidos pela administração central de BC e de DZP (entradas nos braços fechados e número total de entradas nos braços) no labirinto em cruz elevado	66
<b>Figura 11</b> - Influência do pré-tratamento com FMZ nos efeitos induzidos pela administração central de BC e de DZP (estiramentos corporais e imersões de cabeça) no labirinto em cruz elevado	67
<b>Figura 12</b> - Influência do pré-tratamento com FMZ nos efeitos induzidos pela administração central de BC e de DZP (levantamentos e autolimpeza) no labirinto em cruz elevado	68
<b>Figura 13</b> - Influência do pré-tratamento com FMZ na atividade hipno-sedativa induzida pela administração central de BC e DZP avaliada no teste do sono induzido por éter etílico	70
<b>Figura 14</b> - Influência do pré-tratamento com DZP nos parâmetros clássicos avaliados no LCE, em camundongos tratados com a BC	72
<b>Figura 15</b> - Influência do pré-tratamento com DZP nos parâmetros etológicos avaliados no LCE, em camundongos tratados com a BC	73
<b>Figura 16</b> - Influência do pré-tratamento com PTZ nos	

parâmetros clássicos avaliados no LCE, em camundongos tratados com a BC	75
<b>Figura 17</b> – Influência do pré-tratamento com PTZ nos parâmetros etológicos avaliados no LCE, em camundongos tratados com a BC	76
<b>Figura 18</b> - Influência do pré-tratamento com DHEAS nos parâmetros clássicos avaliados no LCE, em camundongos tratados com a BC.	78
<b>Figura 19</b> - Influência do pré-tratamento com DHEAS nos parâmetros etológicos avaliados no LCE, em camundongos tratados com a BC.	79
<b>Figura 20</b> - Influência do pré-tratamento com PCPA nos parâmetros clássicos avaliados no LCE, em camundongos tratados com a BC	81
<b>Figura 21</b> – Influência do pré-tratamento com PCPA nos parâmetros etológicos avaliados no LCE, em camundongos tratados com a BC	82
<b>Figura 22</b> - Efeito do tratamento central com 6-H, 7-H, 6,7-DH, 6-M, 7,8-DH ou 5,7-DH nas entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado	84
<b>Figura 23</b> - Efeito do tratamento central com GL, AP, LT, QC, nas entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado	85
<b>Figura 24</b> - Efeito do tratamento central com 6-H, 7-H, 6,7-DH, 6-M, 7,8- DH ou 5,7-DH no tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado	86
<b>Figura 25</b> - Efeito do tratamento central com GL, AP, LT ou QC, no tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado	87
<b>Figura 26</b> - Efeito do tratamento central com 6-H, 7-H, 6,7-DH, 6-M, 7,8-DH ou 5,7-DH nas imersões de cabeça observadas no teste do labirinto em cruz elevado	88
<b>Figura 27</b> - Efeito do tratamento central com GL, AP, LT ou QC, nas imersões de cabeça observadas no teste do labirinto em cruz elevado	89
<b>Figura 28</b> - Curvas de competição de 6,7- DH e 7,8-DH com [ <sup>3</sup> H]-FNZ, nos ensaios de <i>binding</i> ao sítio benzodiazepínico	92

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Efeito do tratamento central com BC nos parâmetros comportamentais das convulsões induzidas por pentilenotetrazol	61
<b>Tabela 2</b> - Efeito do tratamento central com BC nos parâmetros comportamentais do teste da suspensão pela cauda	62
<b>Tabela 3</b> – Efeito do tratamento central com flavonoides estruturalmente relacionados à BC nos parâmetros entradas nos braços fechados, total de entradas nos braços, estiramentos corporais, comportamentos de levantar e autolimpeza, observados no teste do LCE	91

## **LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b> – Escala de severidade atribuída ao comportamento apresentado no teste das convulsões induzidas por PTZ	44
---	----

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

% – porcentagem  
°C – graus Celsius  
5,7-DH – 5,7-dihidroxi flavona  
6,7-DH – 6,7-dihidroxi flavona  
6-H – 6-hidroxi flavona  
6-M – 6-metoxi flavona  
7,8-DH – 7,8-dihidroxi flavona  
7-H – 7-hidroxi flavona  
AP – apigenina  
BC – baicaleína  
BDZ – benzodiazepínico  
BDZ-R – sítio receptor benzodiazepínico no complexo GABA<sub>A</sub>  
BHE – barreira hemato-encefálica  
cm – centímetros  
DHEAS – dehidroepiandrosterona sulfato de sódio  
DMSO – dimetilsulfóxido  
DZP – diazepam  
EA – entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado  
EF – entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado  
E.P.M. – erro padrão da média  
ER – receptor de estrógeno  
FMZ – flumazenil  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
[<sup>3</sup>H]-FNZ – <sup>3</sup>H-flunitrazepam  
GABA – ácido gama-aminobutírico  
GABA<sub>A</sub> – complexo do ácido gama-aminobutírico do tipo A  
GL – galangina  
GTP – guanosina-5'-trifosfato  
GMP-PNP – análogo do GTP  
i.c.v. – via intracerebroventricular  
CI<sub>50</sub> – concentração inibitória 50%  
CPTZ – convulsões induzidas por PTZ  
i.p. – via intraperitoneal  
IMI – imipramina  
K<sub>d</sub> – constante de dissociação  
K<sub>i</sub> – constante de inibição  
kg – quilograma  
LCE – labirinto em cruz elevado  
LT – luteolina  
μL – microlitro (10<sup>-6</sup> L)



mg – miligrama ( $10^{-3}$  g)

mL – mililitro ( $10^{-3}$  L)

min – minutos

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NO – óxido nítrico

NOS – sintase do óxido nítrico

nmol – nanomol ( $10^{-9}$  mol)

PBS – tampão salina fosfato

PCPA – dl-p-clorofenilalanina etil ester

PEG – propilenoglicol

pmol – pico mol ( $10^{-12}$  mol)

PP – teste da placa perfurada

PTZ – cloridrato de pentilenotetrazol

QC – quercetina

SAR – relação estrutura-atividade

SE – teste do sono etéreo

SNC – sistema nervoso central

s – segundos

TA – tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado

TST – teste da suspensão pela cauda

v.o. – via oral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 PRODUTOS NATURAIS PSICOATIVOS	17
1.2 FLAVONOIDES	19
1.2.1 Características gerais	19
1.2.2 Farmacocinética	23
1.2.3 Atividades farmacológicas	25
1.2.3.1 Atividades no sistema nervoso central	30
<b>2 OBJETIVOS</b>	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
3.1 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	37
3.1.1 Animais	37
3.1.2 Fármacos e Soluções	37
3.1.2.1 Preparação dos fármacos	38
3.1.2.2 Administração dos fármacos	39
3.1.2.2.1 Administração central dos fármacos	39
3.1.2.2.2 Administração sistêmica dos fármacos	40
3.1.3 Procedimentos experimentais e equipamentos	40
3.1.3.1 Sono induzido por éter etílico	40
3.1.3.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)	41
3.1.3.3 Placa perfurada (PP)	42
3.1.3.4 Convulsões induzidas por pentilenotetrazol	43
3.1.3.5 Teste de suspensão pela cauda	44
3.1.3.6 Esquema para procedimentos experimentais	44
3.1.4 Estudo do mecanismo de ação da baicaleína	46
3.1.4.1 Interação com o sistema GABAérgico-benzodiazepínico	46
3.1.4.1.1 Flumazenil	47
3.1.4.1.2 Diazepam	47
3.1.4.2 Interação com o sistema GABAérgico não-benzodiazepínico	48
3.1.4.2.1 Pentilenotetrazol	48
3.1.4.2.2 DHEAS	49
3.1.4.3 Interação com o sistema serotoninérgico	50
3.1.5 Estudo de estrutura-atividade tipo-ansiolítica dos flavonoides estruturalmente relacionados à baicaleína	51
3.1.5.1 Ensaio de <i>binding</i>	52
3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
<b>4 RESULTADOS</b>	55
4.1 ATIVIDADE HIPNO-SEDATIVA	55

<b>4.1.1 Sono induzido por éter etílico</b>	55
<b>4.2 ATIVIDADE TIPO-ANSIOLÍTICA</b>	56
<b>4.2.1 Labirinto em cruz elevado</b>	56
<b>4.2.2 Placa perfurada</b>	59
<b>4.3 ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE</b>	61
4.3.1 Convulsões induzidas por PTZ	61
<b>4.4 ATIVIDADE DO TIPO ANTIDEPRESSIVA</b>	62
4.4.1 Teste da suspensão pela cauda	62
<b>4.5 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BAICALEÍNA</b>	63
<b>4.5.1 Investigação da atividade GABAérgica-benzodiazepínica</b>	63
4.5.1.1 Interação com o flumazenil	63
4.5.1.1.1 <i>Teste do labirinto em cruz-elevado</i>	63
4.5.1.1.2 <i>Teste do sono etéreo</i>	69
4.5.1.2 Interação com o diazepam	71
<b>4.5.2 Investigação da atividade GABAérgica não-benzodiazepínica</b>	74
4.5.2.1 Pré-tratamento com o pentilenotetrazol	74
4.5.2.2 Pré-tratamento com a dehidroepiandrosterona sulfato de sódio (DHEAS)	77
<b>4.5.3 Investigação da atividade serotoninérgica</b>	80
<b>4.6 ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE</b>	83
<b>4.6.1 Ensaio de <i>binding</i></b>	92
<b>5 DISCUSSÃO</b>	93
<b>6 CONCLUSÕES</b>	114
<b>REFERÊNCIAS</b>	116
<b>APÊNDICES</b>	135
<b>APÊNDICE A</b> – Principais atividades farmacológicas de relevância para o SNC encontradas para a baicaleína e flavonoides relacionados	136
<b>APÊNDICE B</b> – Curva dose-resposta de FMZ no teste do LCE	146
<b>APÊNDICE C</b> – Efeito do pré-tratamento com FMZ no comportamento induzido pelo tratamento com DZP ou BC no LCE	147
<b>APÊNDICE D</b> – Curva dose-resposta de DZP no teste do LCE	148
<b>ANEXOS</b>	149
<b>ANEXO A</b> – Folha de aprovação do Comitê de Ética para o desenvolvimento do projeto	150

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 PRODUTOS NATURAIS PSICOATIVOS**

O uso de substâncias psicoativas presentes nas plantas, provém de tempos remotos devido a sua capacidade de alterar a consciência. Contudo, o desafio de tentar desvendar os mecanismos de ação das plantas sobre o humor e cognição, levou a comunidade científica a ignorar inicialmente o fato das mesmas poderem ter também propriedades benéficas e potencial terapêutico. Assim, pouca atenção foi dada à medicina popular (CARLINI, 2003). No entanto, com base nas observações empíricas e no folclore, os extratos de produtos naturais foram os primeiros medicamentos disponíveis para algumas populações e ainda permanecem como cuidado primário à saúde nestes locais.

A partir da década de 40, no século passado, por inúmeros fatores, as plantas medicinais foram suplantadas por compostos farmacêuticos ativos, sendo usados terapeuticamente pela maioria da população ocidental (GANESAN, 2008). Posteriormente, os produtos oriundos de plantas medicinais voltaram a merecer mais atenção, seja pela população, a partir da falsa idéia de que as plantas, por serem originárias diretamente da natureza, seriam menos tóxicas que os medicamentos sintéticos; seja pela indústria farmacêutica que vislumbrou nas plantas medicinais um comércio lucrativo, pois mais e mais pessoas buscavam medicamentos a base de produtos naturais. Esses fatos somados impulsionaram novamente o interesse pelas plantas medicinais (CARLINI, 2003). Atualmente, a demanda por medicamentos à base de plantas vem crescendo mundialmente e a ampliação do consumo levou a normatização do setor com a implementação, e constante revisão, de normas técnicas para a produção e comercialização de medicamentos, visando garantir a segurança no uso e eficácia terapêutica aliada à qualidade do produto. Nos países desenvolvidos, os produtos de origem natural emergem como uma alternativa de tratamento, enquanto nos países em desenvolvimento ainda são resultantes da impossibilidade de acesso aos medicamentos farmoquímicos (DE FREITAS, 2007). Um levantamento recente cobrindo os anos de 1981 a 2006 (NEWMAN, CRAGG, 2007), listou 1.184 novas entidades químicas e, deste total, 52% dos compostos tinham correlação com um produto natural, 18% eram produtos biológicos e 30% eram puramente sintéticos; o que mostra o potencial terapêutico presente nas plantas.

A busca por novas moléculas que atuem no SNC e que possam ter fins terapêuticos começou no século XIX, e muito do que a ciência moderna sabe hoje acerca da neuroquímica do encéfalo e das funções do Sistema Nervoso Central (SNC) pode ser relacionado ao estudo de produtos naturais psicoativos. Como exemplo, os estudos sobre o alcaloide morfina da *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) conduziu à identificação do sistema opioide; os estudos com os canabinoides da marijuana (*Cannabis sativa* L. Cannabaceae) possibilitaram a identificação dos receptores e do sistema endocanabinoide; e os estudos dos alcaloides da *Rauwolfia serpentina* Benth. (Apocynaceae), como a reserpina, forneceram a base da compreensão sobre a transmissão medida por serotonina, norepinefrina e dopamina, bem como sobre a etiologia da depressão, além da hipertensão (GOMES et al., 2009; PRISINZANO, 2009).

Muitos trabalhos têm sido publicados desde então demonstrando a atividade medicinal de plantas como uma nova alternativa terapêutica para o tratamento tanto de distúrbios neuropsiquiátricos, como de doenças neurodegenerativas. Esses estudos demonstram atividades tanto depressoras como estimulantes do SNC e seus efeitos foram atribuídos à presença de alguns tipos de compostos pertencentes às classes dos aminoácidos, alcaloides, compostos polifenólicos e flavonoides (COLETA et al., 2006; COLETA et al., 2008; GOMES et al., 2009; ZHU et al., 2007).

Podemos citar ainda os trabalhos de Zétola e colaboradores (2002), que demonstraram o efeito sedativo da fração hidroalcoólica da *Lippia alba*, planta conhecida com “falsa melissa”, e correlacionaram seu efeito às quantidades de flavonoides presentes nessa fração. Mais tarde, Marques de Carvalho (2006) demonstrou a participação do composto polifenólico verbascosídeo na atividade sedativa da mesma planta. Duarte e colaboradores (2007, 2008) demonstraram a atividade do tipo ansiolítica, anticonvulsivante e hipnosedativa de extratos e frações provenientes da *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), planta encontrada nas regiões montanhosas do sul brasileiro e popularmente conhecida como timutu-pinheirinho, e atribuíram a atividade ansiolítica à presença de um grupo de constituintes presentes na fração acetato de etila, os polifenóis dihidroestiril-2-pironas e as estiril-2-pironas. Sena e colaboradores, em 2009, mostraram o efeito tipo-ansiolítico e potencializador do efeito sedativo, do extrato aquoso, da fração butanólica e da fração residual aquosa, obtidos do pericarpo da *Passiflora edulis* flavicarpa, planta tradicionalmente utilizada como sedativa e para tratar distúrbios do SNC, como ansiedade e insônia.

Estes autores sugeriram ainda o possível envolvimento dos flavonoides C-glicosídeos, como a isoorientina, vicianina-2, espinosina, e 6,8-di-C-glicosilcrisina, presentes neste extrato e nas frações, nos seus efeitos centrais.

Contudo a correlação entre cada composto encontrado em plantas, pertencentes a uma determinada classe química, e uma atividade no SNC não é linear. Assim, a busca por compostos com bioatividade não está restrita a uma classe particular e nem exclui outras classes de compostos (GOMES et al., 2009).

## 1.2 FLAVONOIDES

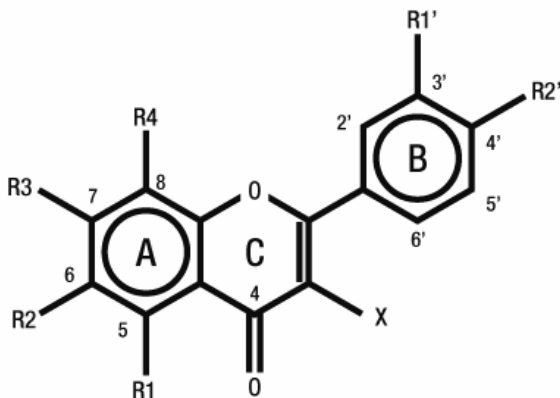
### 1.2.1 Características gerais

A natureza evolui constantemente e nesse processo de evolução produz uma variedade de metabólitos secundários (GANESAN, 2008). Nesse contexto encontram-se os flavonoides. Os flavonoides são substâncias polifenólicas de baixo peso molecular, presentes com relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais e derivados do metabolismo da fenilalanina, pelas vias do ácido chiquímico e ácido acético (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Nos vegetais, os flavonoides desempenham alguns papéis importantes como o de fornecer a cor. A delphinidina fornece tons de lilás e azul, a cianidina fornece a cor magenta e o grupo das flavonas e flavonóis podem atuar como co-pigmentos. Atuam ainda na sobrevivência das plantas, como na proteção contra raios UV-B (p.e. o grupo das antocianidinas) e fornecem resistência contra invasão por patógenos (p.e. alguns isoflavonoides), tanto bactérias como fungos e vírus (p.e., a baicaleína). Quando consideramos a interação planta-animal, os flavonoides podem proteger contra insetos (p.e., a rutina) e mamíferos (p.e., as proantocianidinas) (para revisão, ver HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Quimicamente é possível encontrar flavonoides com diversas formas estruturais, mas sua estrutura fundamental é baseada no núcleo flavonoide que consiste em um núcleo com 15 átomos de carbono (Figura 1). Caracterizam-se por apresentar um ou mais núcleos aromáticos, contendo substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais. Os nomes triviais empregados para os flavonoides possuem, na maioria dos casos, relação à planta na qual foram identificados pela primeira vez. Em 2003, eram conhecidos cerca de 4.200 flavonoides diferentes, sendo que a quase maioria destas estruturas foi identificada

no final de século XX e início do século XXI (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

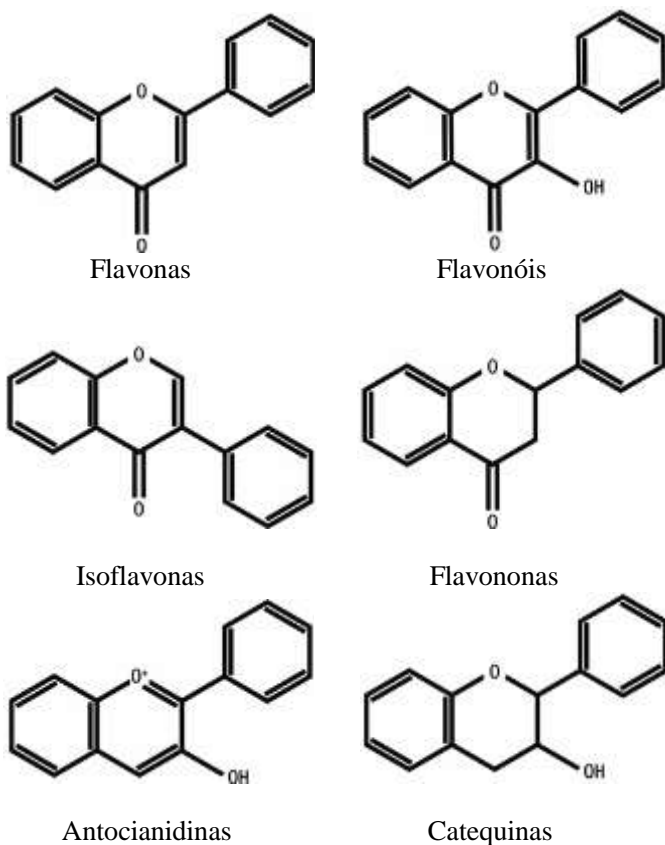


Flavona	X	R1'	R2'	R1	R2	R3	R4
6-metoxiflavona	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
6-hidroxiflavona	H	H	H	H	OH	H	H
7-hidroxiflavona	H	H	H	H	H	OH	H
6,7-dihidroxiflavona	H	H	H	H	OH	OH	H
5,7-dihidroxiflavona (crisina)	H	H	H	OH	H	OH	H
7,8-dihidroxiflavona	H	H	H	H	H	OH	OH
4',5,7-trihidroxiflavona (apigenina)	H	H	OH	OH	H	OH	H
3',4',5,7-tetrahidroxiflavona (luteolina)	H	OH	OH	OH	H	OH	H
3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona (quercetina)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
3,5,7-trihidroxiflavona (galangina)	OH	H	H	OH	H	OH	H

**Figura 1.** Estrutura geral dos flavonoides, com seus núcleos A, C e B. Classe das flavonas: X = H; Classe dos flavonóis: X = OH. Os radicais (R1', R2', X, R1, R2, R3 e R4) variam de acordo com o flavonoides e indicam as posições dos substituintes nos flavonoides presente neste trabalho (Infografia: Frederico Carvalho).

Devido ao grande número de flavonoides existentes, estes são agrupados em classes de acordo com suas características químicas e biossintéticas. Moléculas que são ligadas a um ou mais açúcares são denominadas de *flavonoides glicosídicos*, enquanto moléculas não ligadas aos açúcares são denominadas *agliconas*. Com exceção da classe das catequinas, os flavonoides não ocorrem nas plantas como agliconas e sim, mais frequentemente, como derivados glicosídicos solúveis (para revisão, ver AHERNE; O'BRIEN, 2002). Nessa forma conjugada ou heterosídica, podem ser denominados *C-heterosídeos*, quando o açúcar se liga ao núcleo fundamental por um átomo de carbono, ou *O-heterosídeos*, quando a ligação se dá por meio de uma hidroxila. Também são classificados de acordo com o nível de oxidação do seu anel "C", o que os distribui como antocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavononas e isoflavonas, entre outras classes (Figura 2). As classes mais numerosas são a das flavonas, a dos flavonóis e de seus *O-heterosídeos*, e a dos flavonoides *C-heterosídeos*. Possuem juntas aproximadamente 1.963 constituintes com estruturas conhecidas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). As flavonas e flavonóis diferem pela ausência ou presença de uma hidroxila no C-3 (Figura 1 e 2). Entre os representantes mais conhecidos dessas classes estão a apigenina e a luteolina (flavonas), além da quercetina e do canferol (flavonóis) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).





**Figura 2.** Principais classes de flavonoides (adaptação de AHERNE; O'BRIEN, 2002) (Infografia: Frederico Carvalho).

Como são encontrados em produtos de origem vegetal, utilizados na alimentação humana: cebola, vinho, alface, cebolinhas, maçã, tomate, brócolis, laranja, cacau, chás, etc. (para revisão ver AHERNE; O'BRIEN, 2002), os flavonoides despertaram interesse econômico, inicialmente decorrente de suas diferentes propriedades nas plantas e do seu valor nutricional (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). Trabalhos confiáveis acerca das quantidades de flavonoides presentes em frutas e vegetais, são necessários por ajudarem a estabelecer o papel potencial dos mesmos na dieta preventiva do câncer ou das patologias cardiovasculares. No entanto, é difícil estabelecer uma estimativa do

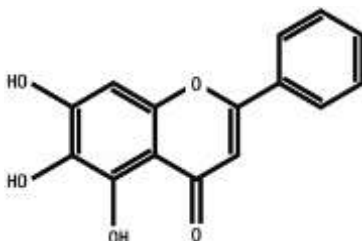
conteúdo total de flavonoides ingeridos diariamente por um ser humano, pois os dados disponíveis na literatura sobre estas quantidades nos alimentos ainda são limitados (HOLLMAN; KATAN, 1999). Estudos mensurando as quantidades de canferol e quercetina em vegetais comestíveis crus revelaram quantidades abaixo de 10 mg/kg, exceto para cebola, brócolis, repolho e feijão que mostraram quantidades de até 486 mg/kg. Com relação às frutas, as quantidades de quercetina variaram em torno de 15 mg/kg, exceto para a maçã onde são encontrados entre 12 e 72 mg/kg (HERTOG et al., 1992). Em função da dieta padrão, estima-se que as quantidades de flavonoides ingeridas diariamente por um indivíduo sejam de cerca de 100 miligramas (HOLLMAN; KATAN, 1999).

### 1.2.2 Farmacocinética

Embora os estudos sobre flavonoides sejam desenvolvidos há décadas, ainda pouco se sabe sobre sua absorção, metabolismo e excreção, bem como sobre sua(s) atividade(s) funcional(is) (ABRAHAMSE et al., 2005). Alguns estudos farmacocinéticos mostram que após administração oral em ratos, os flavonoides sofrem absorção e podem ser detectados na circulação sistêmica (MANACH et al., 1995). Embora haja contradições e dúvidas, principalmente pela diversidade estrutural dos flavonoides, de forma geral, tanto para animais como para seres humanos, supõe-se que os mesmos sejam absorvidos no intestino delgado pelos mecanismos de: difusão passiva, no caso das agliconas, ou que sejam transportados por transporte ativo (transportadores de glicose dependentes de sódio), no caso dos flavonoides glicosídicos, seguindo então para a circulação sistêmica. Eles podem também, durante o processo de absorção, sofrer ação enzimática das hidrolases intestinais presentes na membrana apical ou pelas  $\beta$ -glicosidases citosólicas dos enterócitos (para revisão, ver AHERNE; O'BRIEN, 2002; HOLLMAN et al., 1997; SCALBERT et al., 2002).

Ensaios *in vitro* em uma linhagem de células colônicas (Caco-2) mostraram que a flavona baicaleína (5,6,7-trihidroxiavona) (Figura 3) pode ser transportada por difusão passiva, sofrendo, no entanto, considerável glicuronização e sulfatação durante sua absorção. O transporte celular no sentido apical-basolateral pode ser realizado por difusão passiva devido à boa lipossolubilidade da baicaleína (BC). No entanto, a BC sulfatada e glicuronizada é muito polar para atravessar a barreira lipídica e não é transportada de forma eficiente no sentido apical-basolateral, mas via transporte paracelular por transportadores de

efluxo extracelular, o que possibilita um ciclo entérico para a BC (ZHANG et al., 2007).



**Figura 3.** Estrutura da flavona baicaleína (Infografia: Frederico Carvalho).

O flavonol quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona), administrado pela via oral, pode ser absorvido em trinta minutos, e a concentração dele ou seus metabólitos podem se manter constantes durante as 24 horas seguintes. Segundo Abrahamse e colaboradores (2005), a quercetina pode sofrer metilação, glucoronização e sulfatação durante o transporte ao longo do epitélio intestinal e subsequente passagem pelo fígado, com excreção biliar e ciclo entero-hepático, até a excreção urinária ou fecal (predominante). A quercetina não absorvida, bem como seus metabólitos, pode ser metabolizada pela microflora intestinal. No entanto, nesse experimento, 75% da quercetina administrada não pôde ser recuperada, o que foi atribuído à grande variedade de metabólitos produzidos e não mensurados (ABRAHAMSE et al., 2005). Youdim e colaboradores (2004) forneceram evidências de que os flavonoides, mesmo diferentes estruturalmente, como a naringenina (4',5,7- trihidroxiflavanona) e a quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona), respectivamente uma flavanona e um flavonol, são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica, reforçando a existência de respostas farmacológicas centrais apontadas para estes compostos, após sua administração sistêmica.

Uma vez que os flavonoides podem ser absorvidos, estes compostos têm sido apontados como responsáveis por uma variedade de propriedades relevantes do ponto de vista clínico, como efeitos antineoplásico, anti-isquêmico e anti-inflamatório (AVILA et al., 1994; GERRITSEN et al., 1995).

### 1.2.3 Atividades farmacológicas

Os flavonoides são reconhecidos por atuarem como sequestradores e de espécies reativas de oxigênio. Segundo Tournaire e colaboradores (1993), a estrutura do anel C, principalmente a presença de um grupo hidroxil ativando a dupla ligação, é o principal fator que determina a eficiência da reatividade destes compostos com o radical oxigênio ( $^1\text{O}_2$ ). A literatura atribui a ação antioxidante e sequestradora de radicais livres como responsável por alguns efeitos biológicos dos flavonoides (MORA et al., 1990; ZHU et al., 2007), já que a presença destes compostos em algumas espécies vegetais é a responsável pela atividade antioxidante dessas espécies (ILAVARASAN et al., 2006).

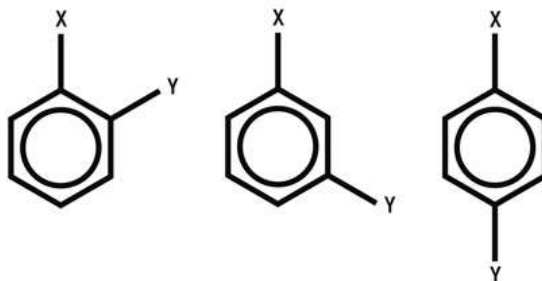
Doronicheva e colaboradores (2007) sugeriram que a posição de grupos funcionais na estrutura dos flavonoides pode interferir na sua interação com a catalase, enzima que atua como antioxidante natural, decompondo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água e, dessa forma, protegendo as células de danos oxidativos que atuariam sobre proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os mesmos autores sugeriram ainda que um único grupo OH no anel “B” representa uma menor atividade antioxidante sobre a peroxidação lipídica, e que as substituições presentes no C-3 seriam importantes em termos de potência na atividade antioxidante contra o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e em acentuar a atividade antioxidante da catalase. Os autores, não conseguiram, no entanto, estabelecer uma clara relação entre os valores de concentração inibitória 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) da atividade “scavenger” sobre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a interação com a catalase.

Chen e colaboradores (2005) demonstraram que o flavonol quercetina apresenta atividade antioxidante cinco vezes maior que o ácido ascórbico (vitamina C). Este mesmo estudo evidenciou a atividade neuroprotetora dos flavonoides como decorrente do seu efeito antioxidante ou da interação com as cascatas de sinalização celular. Entretanto, tentativas de estabelecer uma correlação entre as diferentes atividades dos flavonoides têm se mostrado complexas.

Zhu e colaboradores (2007) tentaram estabelecer uma relação estrutura-atividade entre a atividade estrogênica e a capacidade de prevenir a morte celular induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide. Este peptídeo está envolvido na etiologia da doença de Alzheimer, distúrbio neurodegenerativo caracterizado clinicamente por um declínio envolvendo memória, orientação, julgamento e razão (TANZI; BERTRAM, 2005); decorrentes, entre outros fatores, da deposição de  $\beta$ -

amiloide em placas senis no espaço extracelular e, formação de agregados neurofibrilares dentro dos neurônios, cursando com o estresse oxidativo e a morte celular. Este estudo, desenvolvido com dez classes de flavonoides, investigou as atividades estrogênica, antioxidante, protetora da agregação induzida por peptídeo  $\beta$ -amiloide e protetora da citotoxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide. O estudo mostrou que estas atividades neuroprotetoras não estão diretamente relacionadas com uma atividade estrogênica, bem como com sua ação antioxidante. Nesse trabalho foi ainda demonstrado que dentre os flavonoides estudados, a baicaleína (flavona), a escutelarina (flavona), a hibifolina (flavonol) e a quercetina-3-glicosídeo (flavonol), se destacaram por seu acentuado efeito neuroprotetor. No entanto, novamente, suas atividades neuroprotetoras não se relacionaram diretamente com suas atividades estrogênicas. Zhu e colaboradores (2007) descreveram ainda que a apigenina (4',5,7-trihidroxiflavona) tem uma acentuada (++++) atividade estrogênica, moderada (++) antioxidante e não apresenta qualquer atividade anti- $\beta$ -amiloide (-); enquanto a baicaleína (5,6,7-trihidroxiflavona) apresenta uma moderada atividade estrogênica, não apresenta qualquer atividade anti-oxidante, e possui de moderada a média (+++) ação anti- $\beta$ -amiloide. A crisina (5,7-dihidroxiflavona) produz apenas uma leve (+) atividade estrogênica, sem nenhuma atividade anti-oxidante ou anti- $\beta$ -amiloide.

A respeito da atividade estrogênica, Choi e colaboradores (2008) realizaram um estudo tentando estabelecer a relação entre a estrutura e a estrogenicidade (atividade estrogênica) de flavonoides, testando o grupo das flavonas, isoflavonas e outros compostos de estrutura semelhante. Estes pesquisadores mostraram que a apigenina, uma flavona, apresenta modesta afinidade de ligação aos receptores de estrogênio (ER) do tipo ER $\beta$  e ER $\alpha$ , enquanto a crisina, diferente da apigenina pela ausência de uma hidroxila na posição C-4' do anel B, tem afinidade apenas pelo receptor ER $\beta$ . De forma geral, os flavonoides mostram maior afinidade ao receptor ER $\beta$  que ao ER $\alpha$ , e a presença de grupos hidroxil na posição C-4' e C-7, e não na posição C-5, está mais associada à estrogenicidade das flavonas. Enquanto a presença de dois grupos hidroxil na posição orto (Figura 4) parece reduzir a estrogenicidade dos flavonoides, como observado para a 6,7-dihidroxiflavona, que não revelou estrogenicidade (CHOI et al., 2008). Ou seja, pequenas modificações estruturais podem modificar de forma significativa a estrogenicidade dos flavonoides.



**Figura 4.** Estrutura orto, meta e para, relativa à posição de dois substituintes num anel benzênico (Infografia: Frederico Carvalho).

O trabalho de Ohno e colaboradores (2004) mostrou que a 6-hidroxiavona, uma avona sintética, possui uma estrutura molecular dos anéis A-C, quase plana e com uma hidroxila na posição C-6, semelhante à dehidroepiandrosterona (esteroide neuroativo), o que lhe confere forte atividade inibitória sobre a enzima 3-hidroxiesteroide desidrogenase ( $K_i = 0,19 \mu\text{M}$ ), envolvida na síntese de progesterona e androstenediona. As avonas 7-hidroxiavona e 6-metoxiavona, com estrutura parecida, possuem uma atividade inibitória mais discreta. Neste mesmo trabalho, a apigenina e a crisina, ambas com uma hidroxila na posição C-7, foram identificadas com fraca atividade inibidora da 3-hidroxiesteroide desidrogenase. Esses trabalhos reforçam, portanto, que estudos de estrutura-atividade permitem selecionar moléculas que tenham maior afinidade por um determinado receptor ou tenham uma atividade farmacológica comum.

No que diz respeito ao sistema cardiovascular, trabalhos epidemiológicos têm indicado que a ingestão regular de polifenóis, presentes nas uvas, como os flavonoides, está associada à redução do risco de doenças cardiovasculares. Esse hábito é observado nas populações mediterrâneas, e explica o fenômeno do “paradoxo francês”, segundo o qual a dieta rica em gordura saturada está associada a um reduzido risco de doenças cardiovasculares, quando se esperaria um aumento deste risco (ZERN; FERNANDEZ, 2005).

Os compostos polifenólicos estão presentes em quantidade considerável nas cascas de uvas, utilizadas na fabricação de vinho tinto. A catequina (avona), por exemplo, é o flavonoide mais abundante, com quantidades de até 190 mg/L por litro de vinho tinto, mas também estão presentes em menores quantidades os flavonoides epicatequina

(flavana), quercetina e rutina (flavonóis), entre outros. De acordo com o trabalho de Frankel e colaboradores (1993 apud HARBORNE; WILLIAMS, 2000), a epicatequina e a quercetina contribuem para a atividade protetora do vinho tinto contra a aterogênese. Esses efeitos protetores cardiovasculares podem estar associados à atividade vasodilatadora e protetora da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade. Além disso, alguns autores sugerem que flavonoides, como a apigenina (flavona) e o canferol (flavonol), podem aumentar a atividade da sintase do óxido nítrico (NOS) endotelial e ao mesmo tempo inibir a atividade da NOS induzida, pela inibição de fatores de transcrição (para revisão, ver BENAVENTE-GARCÍA; CATILLO, 2008), o que contribuiria para seus efeitos cardiovasculares.

A quercetina (flavonol), um dos flavonoides mais estudados, parece também ter efeitos benéficos nas doenças neurodegenerativas ao prevenir o dano neuronal relacionado à inflamação. Chen e colaboradores (2005) mostraram que a quercetina inibe a formação de óxido nítrico (NO) induzido por lipopolissacarídeo (LPS) e interferon gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ) em células microgliais de roedores, de forma concentração-dependente. Essa ação é resultado da interação com o fator nuclear- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), a proteína de ativação-1 (AP-1), o transdutor de sinal e ativador de transcrição-1 (STAT1) e o fator regulatório de interferon (IRF-1). Essa atividade também foi descrita para a flavona baicaleína, sendo que alguns efeitos observados para este último flavonoide podem ser causados pela inibição de mecanismos dependentes da NOS endotelial.

Chen e colaboradores (2004) relataram que a baicaleína inibe a produção de NO e a expressão da NOS induzida (iNOS) em células da micróglia. A atividade inibidora da produção de NOS induzida por citocinas e endotoxina foi atribuída a uma possível inibição da expressão de iNOS através da hiporregulação de fatores de transcrição, como o fator nuclear IL-6 (NF-IL6). Sugeriu-se, então, que os efeitos inibitórios da baicaleína sobre a ativação da micróglia e produção de fatores neurotóxicos pode ser responsável por sua ação neuroprotetora. A baicaleína exibe ainda algumas atividades farmacológicas no sistema cardiovascular devido a uma ação sequestradora de radicais livres e inibidora da xantina oxidase, mostrando efeito protetor aos danos cardiovasculares induzidos pelo estresse oxidativo. Além disso, este flavonoide reduz a pressão arterial *in vivo*, sendo que este efeito pode ser parcialmente atribuído a sua atividade inibidora da lipoxigenase, como resultado da menor síntese e liberação de produtos

vasoconstritores da cadeia do ácido aracdônico (para revisão, ver HUANG et al., 2005).

Com relação à ação anti-inflamatória, os flavonoides podem inibir as vias da ciclo-oxigenase e/ou 5-lipoxigenase da via do ácido aracdônico, como já descrito para a santina (6-hidroxicanferol 3,7,4'-trimetil éter) e a 8-hidroxiluteolina. A quercetina-3-raminosídeo, a artemetina (5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona), o canferol, a hesperitina, apigenina e quercetina, entre outros flavonoides, já demonstraram atividade anti-inflamatória em alguns modelos experimentais (para revisão, ver HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os flavonoides podem ainda interagir com transportadores celulares, como as proteínas associadas à multirresistência de drogas (MRPs), como, por exemplo, a glicoproteína P (P-gp), sendo que a estrutura do flavonoide, como sua conformação espacial e o número e posição das hidroxilas na molécula, afeta essa interação (para revisão, ver KITAGAWA, 2006). A flavona baicaleína, intracelularmente, inibe, de forma concentração-dependente, o aumento da concentração de cálcio e de inositol fosfato induzido pela histamina, atribuindo-se esta ação a uma redução da atividade da fosfolipase C, em células de glioma de rato (KYO et al., 1998). A baicaleína inibe ainda a atividade da xantina oxidase, com concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) 9,44  $\mu$ M (CHANG et al., 1993), além de interagir com o sistema microssomal hepático. Kim e colaboradores (2002) relataram ainda uma atividade inibidora do citocromo P-450 CYP3A4 e CYP1A2 ( $CI_{50}$ =17,4  $\mu$ M). Vários flavonoides, como a apigenina, quercetina e miricetina, mostraram atividade inibidora da xantina oxidase, que catalisa a oxidação da xantina e hipoxantina a ácido úrico, sendo que as análises cinéticas inclusive sugerem uma interação com seu sítio reativo (LIN et al., 2002).

Os derivados fenólicos naturais, como os flavonoides, também podem se ligar em receptores de adenosina, e já forneceram uma estrutura para o desenvolvimento de antagonistas dos receptores  $A_3$  desse neuromodulador, com efeitos biológicos no sistema cardiovascular, em processos inflamatórios e no SNC. A afinidade de derivados flavonoides por esse receptor sugere que estes podem modular a adenosina, assim como outros neuromoduladores endógenos (JACOBSON, 1998), o que pode ser importante para seus efeitos neuroprotetores.



### 1.2.3.1 Atividades no sistema nervoso central

Além das diversas atividades em variados tecidos, os flavonoides exercem também atividades farmacológicas que podem modular funções do SNC (ver apêndice A). Alguns efeitos são explicados pela interação com o sítio benzodiazepínico localizado no complexo receptor do ácido  $\gamma$  aminobutírico (receptores do tipo GABA<sub>A</sub>) (VIOLA et al., 1995; WOLFMAN et al., 1994; ZANOLI et al., 2000), um canal de íons operado por ligante que medeia o influxo de íons cloreto, conduzindo à hiperpolarização da membrana neuronal. Porém, a modulação do canal que conduz cloreto também é possível pela interação com outros sítios alostéricos, como é o caso de: barbitúricos, anestésicos gerais, neuroesteroides, picrotoxina e outros convulsivantes, etanol e cátions (IGUAL, 1994; KORBI et al., 2002).

O sítio benzodiazepínico está localizado na interface das subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$ , da composição proteica pentamérica do receptor GABA<sub>A</sub>. Esse receptor pode se apresentar com diversas composições, dada a variedade subunidades que o constituem e suas diferentes famílias ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\epsilon$ 1,  $\delta$ 1,  $\theta$ 1,  $\rho$ 1-3) (MÖHLER et al., 2006). Fármacos que interagem com o receptor benzodiazepínico atuam nos receptores dos subtipos  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  (60% do total de receptores GABA<sub>A</sub>),  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  (15-20%),  $\alpha_3\beta_n\gamma_2$  (10-15%) e  $\alpha_5\beta_{1,3}\gamma_2$  (<5% do total), produzindo, assim, efeito sedativo/anticonvulsivante, além do ansiolítico, modulando a memória espacial e desencadeando outros efeitos ainda não esclarecidos (MÖHLER, 2006). Os flavonoides têm inclusive servido como base para a síntese de antagonistas dos receptores benzodiazepínicos, no intuito de encontrar novos antagonistas para este receptor, o que é importante no tratamento de intoxicações por benzodiazepínicos ou no tratamento de déficits de cognição (LOPES et al., 2004).

Estudos de estrutura-atividade da interação entre derivados de flavonas e o sítio de ligação benzodiazepínico do complexo do receptor GABA<sub>A</sub> mostram que algumas delas podem exibir atividade ansiolítica provavelmente devido a essa interação. Um modelo molecular de análise da relação estrutura-atividade (SAR) estabelece algumas características para possibilitar a interação de uma flavona com o receptor localizado no complexo GABA<sub>A</sub> e descreve a relevância de efeitos elétricos no *binding* do ligante. Essa interação está associada com eventos eletrônicos do átomo de oxigênio carregado negativamente no grupo

carbonil do flavonoide, e da natureza dos substituintes na posição C-6 ou C-3' (MARDER et al., 2001).

Estes estudos de SAR permitem selecionar moléculas que tenham maior afinidade por um determinado receptor, e dessa forma selecionar um efeito em detrimento de outro. No caso de drogas que atuam em receptores benzodiazepínicos, há um interesse crescente na identificação de ligantes seletivos para subtipos de receptores, direcionados para tratar a ansiedade, os distúrbios do sono, convulsões ou déficits de memória, com poucos ou sem efeitos colaterais (MARDER et al., 2001). Assim, diversos flavonoides foram objeto de ensaios *in vitro* e alguns comportamentais, sugerindo efeito no sistema nervoso central, destacando-se os flavonoides pertencentes ao grupo das flavonas.

A hispidulina (4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona), por exemplo, foi descrita por Kavvadias e colaboradores (2004), como um potente ligante do receptor GABA<sub>A</sub>. Ela exibe um efeito modulador alostérico positivo em receptores GABA<sub>A</sub> do subtipo  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  de forma concentração dependente, sendo a estimulação máxima atingida com a concentração de 10  $\mu$ M. Essa atividade é bloqueada pelo antagonista benzodiazepínico flumazenil. Curiosamente, a hispidulina também interage com o receptor do subtipo  $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ , fato até então inédito para um flavonoide. Esse mesmo trabalho demonstrou, em ensaios *in situ* e *in vivo*, que a hispidulina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e promover efeitos anticonvulsivantes no tratamento crônico, por via oral (v.o.) em gerbilos, enfatizando a interação com o receptor GABA<sub>A</sub> e os efeitos comportamentais (KAVVADIAS et al., 2004).

O flavonoide quercetina foi descrito como ligante do receptor de glutamato (CI<sub>50</sub>=216  $\mu$ M) e do GMP-PNP (CI<sub>50</sub> = 396  $\mu$ M), um análogo do GTP (guanosina-5'-trifosfato), que se liga ao(s) sítio(s) extracelular(es), modulando a transmissão glutamatérgica no cérebro de rato (MARTINI et al., 2000). Dimpfel (2009) demonstrou recentemente, em experimentos de eletrofarmacografia da atividade elétrica do cérebro de rato, que após a administração oral de quercetina, os padrões apontam para um efeito inibitório sobre a enzima monoaminoxidase, sugerindo efeito do tipo antidepressivo e corroborando com experimentos realizados anteriormente tanto *in vitro* (LEE et al., 2001), como *in vivo* (ANJANEYULU et al., 2003).

Coleta e colaboradores (2008) descreveram a atividade tipo-ansiolítica da luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona), quando administrada a camundongos, pela via oral, na dose de 5 mg/kg, no teste

do labirinto em cruz elevado e teste da placa perfurada, e efeito hipno-sedativo na dose de 10 mg/kg, no teste do sono induzido por pentobarbital. Embora capaz de se ligar a receptores do tipo benzodiazepínicos, sua afinidade pelo receptor é baixa, com  $K_i = 60 \mu\text{M}$ , e, portanto, essa interação não seria a responsável pela atividade encontrada para este flavonoide. Coleta e colaboradores observaram ainda um efeito do tipo antidepressivo para a luteolina no teste do nado forçado, quando administrada cronicamente (14 dias) na dose de 5 mg/kg, e um efeito bloqueador da catalepsia induzida pelo haloperidol na mesma dose, porém de forma aguda, sugerindo um efeito sobre um sistema diferente do GABAérgico, como o serotoninérgico e/ou dopaminérgico, embora estas hipóteses necessitem ser melhor investigadas. No entanto, os autores não descartam a possibilidade de um possível metabólito da luteolina ser o responsável pela atividade farmacológica e este sim ter alta afinidade pelo receptor benzodiazepínico, uma vez que não há dados na literatura que possam comprovar ou refutar esta hipótese.

A crisina (5,7-dihidroxi-flavona), um flavonoide já descrito na *Passiflora coerulea*, é considerada como um dos constituintes responsáveis pelo seu efeito ansiolítico (WOLFMAN et al., 1994). Esta flavona foi descrita como um ligante competitivo do receptor benzodiazepínico, com  $K_i = 3 \mu\text{M}$ , e esta interação considerada responsável por sua atividade anticonvulsivante, a qual foi antagonizada pelo flumazenil (MEDINA et al., 1990). Segundo Zanolli e colaboradores (2000), a 5,7-dihidroxi-flavona (25-100 mg/kg i.p.) possui efeito ansiolítico em ratos no teste da caixa claro-escuro e efeito sedativo no teste do campo aberto, no entanto, apenas o efeito ansiolítico pôde ser bloqueado pelo tratamento com flumazenil na dose de 3 mg/kg.

Recentemente, Ren e colaboradores (2010), descreveram a atividade da 6-hidroxi-flavona (6-H), um ligante do receptor benzodiazepínico, como ativador de correntes em  $\text{GABA}_A$ , através de sítios benzodiazepínicos. Esse efeito foi bloqueado pelo antagonista flumazenil. O estudo também mostrou que a 6-H se liga a receptores que contenham subunidades do subtipo  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . Além disso, a mesma flavona exibiu efeito do tipo-ansiolítico, desprovido de qualquer efeito sedativo, quando administrada pela via oral, no teste do LCE (REN et al., 2010).

Uma atividade similar foi descrita para a flavona apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona), isolada de *Matricaria recutita* (VIOLA et al., 1995). Experimentos *in vitro* demonstraram que a apigenina pode se

ligar a receptores benzodiazepínicos com  $K_i = 4 \mu\text{M}$ , enquanto experimentos *in vivo* revelaram que a apigenina exerce efeitos ansiolíticos em camundongos (VIOLA et al., 1995), e esse efeito foi atribuído a sua interação com o receptor  $\text{GABA}_A$ . Posteriormente, foram descritos efeitos sedativos e antidepressivos, avaliados no teste do nado forçado) (NAKAZAWA et al., 2003), e um favorecimento da aquisição e consolidação da memória no teste do campo aberto (SALGUEIRO et al., 1997); sem, entretanto, apresentar qualquer ação anticonvulsivante ou miorrelaxante (VIOLA et al., 1995). Zanoli e colaboradores (2000) confirmaram o efeito sedativo, mas não o ansiolítico, para este flavonoide, em ratos, nos testes do campo aberto e da caixa claro-escuro. Estes últimos autores observaram também que o efeito sedativo não foi bloqueado pelo flumazenil. O efeito sedativo da apigenina não pode, portanto, ser atribuído a uma mera interação com o sítio benzodiazepínico do receptor  $\text{GABA}_A$ . O trabalho de Avallone e colaboradores (2000) corrobora este estudo, descrevendo apenas efeitos sedativos, mas não ansiolíticos (teste do LCE), nem miorrelaxantes (teste do arame), ou anticonvulsivantes (picrotoxina), para a apigenina administrada pela via intraperitoneal em ratos. Além disso, considerou a afinidade da apigenina pelo receptor benzodiazepínico muito baixa ( $\text{CI}_{50}=2,5 \times 10^{-4}\text{M}$ ), mas mostrando que mesmo assim ela reduz as correntes de  $\text{Cl}_2$  ativadas por  $\text{GABA}_A$ , e que seu efeito sedativo não é bloqueado pelo flumazenil.

Curiosamente, tanto a apigenina quanto a crisina, quando administradas pela via intraperitoneal, não foram capazes de modificar o tempo de sono induzido pelo pentobarbital (ZANOLI et al., 2000). Esse conjunto de dados sugeriu que a apigenina exerce seus efeitos por interagir com outros sítios que não somente o benzodiazepínico, e que este flavonoide atua provavelmente em outros sistemas de neurotransmissão que não o do GABA (AVALLONE et al., 2000). Trabalhos posteriores de Losi e colaboradores (2004) mostraram que a apigenina reduz a atividade do receptor NMDA, sendo que esta interação pode justificar alguns efeitos descritos para esta flavona.

Jarry e colaboradores (2003) identificaram a apigenina em extratos de *Vitex agnus-castus* e atribuíram a este composto pelo menos parte da atividade fitoestrogênica do vegetal, uma vez que a apigenina se ligou em receptores de estrogênio (ER). Em 2008, Yi e colaboradores (2008) descreveram que a apigenina, em doses que variaram de 7-20 mg/kg, por via oral, foi capaz de promover um efeito do tipo antidepressivo no teste do nado forçado e no teste de estresse crônico moderado. Além disso, a apigenina atenuou as alterações nos níveis de

alguns neurotransmissores induzidas pelo estresse crônico, como os de serotonina, seu metabólito (5-HIAA) e de dopamina, em algumas regiões do cérebro (p.e., no córtex préfrontal e hipocampo). Estes mesmos autores sugeriram então que os efeitos do tipo antidepressivos, induzidos pelo tratamento oral com a apigenina, podem ser resultantes de múltiplas atividades bioquímicas, a serem ainda investigadas.

Dentre as flavonas, estruturalmente relacionadas à apigenina, que agem no SNC está a baicaleína (BC) (5,6,7-trihydroxiflavona;  $C_{15}H_{10}O_5$ ; PM=270,24) (Figura 2). As pesquisas com esse flavonoide iniciaram na década de 70 do século XX e evoluíram muito lentamente, sendo retomadas de forma mais intensa nos últimos anos. Sua presença foi descrita principalmente na *Scutellaria baicalensis* (HEO et al., 2004; HUANG et al., 2005; KIMURA et al., 1997; WANG et al., 2002), *Scutellariae radix* (KIM et al., 2002; KIMURA, et al., 1997) e *Oroxylum indicum* (CHEN et al., 2003). Como já descrito anteriormente, a baicaleína possui atividade antioxidante, equivalente à do ácido ascórbico (BOCHORAKOVA et al., 2003), o que lhe confere, segundo Heo e colaboradores (2004), ação protetora contra a citotoxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide. Um estudo, analisando a atividade da baicaleína na amnésia induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide, mostrou que o flavonoide *per se* não facilita os efeitos cognitivos de aquisição ou consolidação da memória, mas que as doses de 5 e 10 mg/kg, i.p., num pré-tratamento agudo, ou 10 e 15 mg/kg, i.p., num pós-tratamento crônico, atenuam a amnésia induzida por esse peptídeo (WANG et al., 2004), isto é, a baicaleína protege dos déficits causados por esta proteína indicando seu potencial terapêutico na doença de Alzheimer. Segundo Cheng e colaboradores (2008), a baicaleína (200 mg/kg, v.o. por 7 dias) ainda protege camundongos da neurotoxicidade induzida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), podendo ser de grande valor também no tratamento da doença de Parkinson. O trabalho de Mu e colaboradores, em 2009, mostrou que a BC apresenta potencial como neuroprotetor para o parkinsonismo induzido experimentalmente por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), tanto *in vivo* como *in vitro*, protegendo culturas de células PC12 de apoptose e protegendo ratos dos tremores induzidos pela 6-OHDA. Estes autores sugerem que este efeito protetor decorre da ação antiapoptótica como pró-diferenciadora e anti-inflamatória.

Como já descrito anteriormante, além da BC e dos flavonoides apigenina, crisina (5,7-dihydroxiflavona), 6-hidroxiflavona, 7,8-dihidroxiflavona, luteolina e quercetina, outras flavonas e flavonois

relacionados estruturalmente à BC, podem apresentar potencial terapêutico para os distúrbios do SNC (COLETA et al., 2008; REN et al., 2010; WANG et al., 2004; WOLFMAN et al., 1994; JANG et al., 2010). Entretanto, para estes flavonoides, como 7-hidroxiflavona, 6,7-dihidroxiflavona, 6-metoxiflavona e galangina, não há relatos na literatura acerca destes efeitos, embora trabalhos *in vitro* demonstrem sua interação com enzimas envolvidas na síntese de hormônios esteroidais, sugerindo um possível efeito sobre o comportamento (OHNO et al., 2004).

Como pode ser observado, os flavonoides são responsáveis por uma ampla variedade de efeitos farmacológicos. Embora constituam um dos grupos de metabólitos secundários com grande potencial terapêutico curativo e preventivo de várias enfermidades, ainda são necessários mais estudos farmacológicos, clínicos e toxicológicos que permitam o uso destas substâncias com maior segurança (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). No SNC, estes compostos são potencialmente úteis como ferramenta terapêutica, tanto para a compreensão, como para tratamento de distúrbios neurodegenerativos e do comportamento (CHENG et al., 2008; HEO et al., 2004; SALGUEIRO et al., 1997). As classes das flavonas e flavonóis se destacam pelas atividades já descritas, em particular a BC, com uma provável atividade protetora contra as doenças de Alzheimer e Parkinson. No entanto, os trabalhos desenvolvidos geralmente se limitam a demonstrar uma atividade específica, muitas vezes não esclarecendo totalmente os mecanismos envolvidos no efeito apresentado e o potencial terapêutico dos flavonoides a ela relacionados, sem, portanto, estabelecer uma relação estrutura-atividade comportamental. Além disso, o uso de vias sistêmicas em ensaios comportamentais não esclarece se o efeito farmacológico observado é promovido pelo flavonoide ou por seus metabólitos, uma vez que sofrem extenso metabolismo (ABRAHAMSE et al., 2005; AHERNE; O'BRIEN, 2002; HOLLMAN et al., 1997; SCALBERT et al., 2002; SHIA et al., 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a atividade farmacológica da baicaleína e dos flavonoides a ela relacionados, no SNC, na tentativa de elucidar a relação estrutura-atividade comportamental, utilizando a via i.c.v.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o perfil de atividade farmacológica no SNC da baicaleína, em camundongos, usando testes comportamentais.
- Investigar o mecanismo de ação da BC, via interação com os sistemas GABAérgico e serotoninérgico.
- Realizar um estudo de estrutura-atividade ansiolítica das flavonas estruturalmente relacionadas à baicaleína, usando o teste do labirinto em cruz elevado no biomonitoramento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

##### 3.1.1 Animais

Foram usados camundongos Swiss adultos fêmeas, provenientes do Biotério Central da UFSC, pesando entre 30 e 45 g. Os animais foram alojados em grupos de 10-20 animais por caixa, com água e ração *ad libitum*, exceto durante a vigência dos experimentos, e mantidos num ciclo claro/escuro de 12 h/12 h (luzes acesas às 7:00 h), num ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Todos os animais foram habituados às condições do laboratório por, pelo menos, uma semana antes do início dos testes comportamentais. Os experimentos comportamentais e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (23080.08007244/006-70/CEUA/UFSC). Procurou-se usar um número mínimo de animais e uma duração mínima de observação que permitissem obter dados consistentes em todos os experimentos. Todos os animais ainda foram habituados numa sala similar à sala experimental durante 1 h antes do início dos testes comportamentais e os experimentos propriamente ditos foram sempre realizados entre 8:00 e 12:00 h.

Como foram utilizadas fêmeas, fez-se necessário avaliar a fase do ciclo estral em que se encontravam e não foram considerados para análise estatística animais em fase de estro (menos de 10% do total).

Após o término dos testes farmacológicos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e conservados em *freezer* para posterior verificação do local da injeção, só sendo considerados para análise estatística os animais que receberam a injeção em um dos ventrículos cerebrais (cerca de 80-90% do total).

##### 3.1.2 Fármacos e Soluções:

Foram utilizados os seguintes fármacos e compostos:

- 5,7-dihidroxi flavona ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ , PM= 254,23) – Roth, Germany;
- 6,7-dihidroxi flavona ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ , PM= 254,22) – Roth, Germany;
- 6-hidroxi flavona ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$ , PM= 238,26) – Roth, Germany;



- 6-metoxiflavona ( $C_{16}H_{12}O_3$ , PM= 252,27) – Roth, Germany;
- 7,8-dihydroxiflavona ( $C_{15}H_{10}O_4$ , PM= 254,22) – Roth, Germany;
- 7-hidroxiflavona ( $C_{15}H_{10}O_3$ , PM= 238,26) – Roth, Germany;
- Apigenina ( $C_{15}H_{10}O_5$ , PM=270,24) – Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA;
- Baicaleína ( $C_{15}H_{10}O_5$ , PM=270,24) – Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA;
- Cloreto de sódio – Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil, usado como diluente;
- Dehidroepiandrosterona sulfato de sódio – RBI, MA, USA; modulador negativo do receptor  $GABA_A$  (HIRANI et al., 2005);
- Diazepam – Dienpax ® , Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP, usado como droga sedativa/ansiolítica padrão, agonista  $GABAérgico$  (CARLINI; BURGOS, 1979);
- DI-p-clorofenilalanina etil Ester – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA, antagonista da síntese de serotonina (TENEN, 1967);
- Éter etílico P.A. – Laboratório F. Maia, São Paulo, Brasil, utilizado como anestésico volátil (TREVOR; MILLER, 1998);
- Flumazenil – Tocris, Park Ellisville, MO, USA; antagonista no sítio benzodiazepínico- $GABAérgico$  (MÖHLER; RICHARDS, 1981);
- Galangina ( $C_{15}H_{10}O_5$ , PM=270,24) – Sarsyntex, Merignac, France;
- Imipramina – Laboratório Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA, inibidor da recaptação de serotonina;
- Luteolina ( $C_{15}H_{10}O_6$ , PM= 286,24) – Sarsyntex, Merignac, France;
- Pentilenotetrazol – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; antagonista não competitivo do complexo  $GABA_A$  (MACDONALD; OLSEN, 1994);
- Quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ , PM= 302,24) – Sarsyntex, Merignac, France;
- Tampão Salina Fosfato – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, usado como diluente.

### 3.1.2.1 Preparação dos fármacos

Os flavonoides foram solubilizados em uma solução estoque contendo 100% de dimetilsulfóxido (DMSO), dividida em alíquotas e armazenada pelo tempo máximo de 4 semanas em *freezer*. No dia do

experimento as soluções finais de cada flavonoide foram preparadas em diluições sucessivas de PBS de forma a compor soluções finais contendo 1% de DMSO. No momento da preparação, as soluções de flavonoide/veículo, foram levemente aquecidas até o máximo de 50°C, em banho-maria e, mantidas a 25-35°C durante o uso, sendo as sobras desprezadas após a realização de cada experimento. O diazepam foi dissolvido numa solução de propilenoglicol (PEG) e posteriormente em solução salina (cloreto de sódio 0,9%) de forma a compor uma solução final em PEG a 10%. A dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) foi solubilizada em 100% de DMSO e posteriormente, em solução salina até a concentração final de 0,1% de DMSO. As demais preparações foram solubilizadas em solução salina. De forma geral, as soluções finais foram preparadas no dia da realização dos experimentos e mantidas à temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante o uso.

### 3.1.2.2 Administração dos fármacos

#### 3.1.2.2.1 Administração central dos compostos

Para a via intracerebroventricular (i.c.v.), o volume foi fixado em 2  $\mu\text{l}$ /animal. Todas as injeções centrais em camundongos foram feitas com base na técnica de *free-hand* (LAURSEN; BELKNAP, 1986). Neste protocolo os animais foram anestesiados em câmara saturada com éter etílico (5 ml). Uma cânula, confeccionada a partir de uma agulha 0,45 x 13 mm, foi acoplada a uma seringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$ , com auxílio de um tubo de polietileno (PE-20 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA). O local de injeção foi determinado pelo traçado de uma linha imaginária que une as comissuras palpebrais laterais e sua intersecção com a linha longitudinal que divide a calota craniana ao meio, deslocando-se lateral e caudalmente cerca de 1 mm. Neste ponto a agulha foi inserida perpendicularmente a uma profundidade de 3 mm.

Os mesmos procedimentos foram adotados para os animais do grupo controle, porém estes receberam somente veículo (DMSO 1% em PBS).

Os animais foram tratados por essa via 5 min antes dos testes farmacológicos. Esse tempo se faz necessário para que animal se recupere da anestesia etérea e para a distribuição do fármaco injetado no SNC, conforme resultados prévios de nosso laboratório (TEIXEIRA, 2003).

### 3.1.2.2.2 Administração sistêmica dos fármacos

Para os fármacos administrados pela via intraperitoneal (i.p.) manteve-se sempre o volume de 10 mL para cada quilo de peso do animal. A imipramina (15 mg/kg, i.p.) foi administrada, nos controles positivos, 30 min antes dos testes farmacológicos. O pentilenotetrazol (PTZ – 80 mg/kg, i.p.), na dose convulsivante, foi administrado a todos os animais no momento da indução das convulsões. Como modulador negativo GABAérgico, o PTZ foi administrado na dose de 20 mg/kg, 20 min antes do tratamento com o flavonoide/veículo. A dl-p-clorofenilalanina etiléster (PCPA – 100 mg/kg, i.p.) foi administrada diariamente, uma vez ao dia, durante 4 dias, sendo no quarto e último dia injetada 40 min antes dos tratamentos. A dehidroepiandrosterona sulfato de sódio (DHEAS – 1 mg/kg, i.p.) foi administrada 30 min antes dos tratamentos pela via i.c.v. O diazepam (0,25 mg/kg) ou o flumazenil (1 mg/kg) foram administrados por via i.p., 20 min antes do tratamento com o flavonoide/veículo pela via i.c.v. O éter etílico (5 mL/ bola de algodão de 2 g, 10 min de saturação prévia) foi administrado por via inalatória, numa câmara de saturação durante cerca de 30 s, 5 min antes do teste. Uma única saturação de éter foi utilizada para apenas 3 animais, em sequência, após a qual, uma nova saturação foi obtida para mais 3 animais, e assim sucessivamente. No teste da hipnose induzida por éter etílico, o éter foi administrado durante 1,5-2 min, em câmara de saturação apropriada, para cada 3 animais.

## 3.1.3 Procedimentos experimentais e equipamentos

### 3.1.3.1 Sono induzido por éter etílico (SE)

No intuito de investigar a atividade hipno-sedativa da BC foi selecionado o teste do sono induzido por éter etílico, ou hipnose induzida por éter. A BC, foi administrada nas concentrações de 0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 2; 20; 200 e 2000 pmol/2 µl, i.c.v. O diazepam, na concentração de 11 pmol/ 2µl, i.c.v., constituiu o grupo controle positivo.

O protocolo experimental foi realizado conforme descrito a seguir. Uma câmara de vidro transparente e fechada com dimensões 30 cm x 20 cm de diâmetro, foi previamente saturada com éter etílico. A saturação foi obtida pelo umedecimento de uma bola de algodão de tamanho padrão (2 g) com 5 mL de éter etílico, colocada no recipiente a

20 cm do nível do chão, 10 min antes da realização dos testes farmacológicos. Cada camundongo foi introduzido individualmente na câmara saturada. Após a perda de reflexo de endireitamento, aguardou-se 1 min para a retirada do animal da câmara e o animal recebeu o tratamento com o flavonoide/veículo e, imediatamente após, foi colocado em decúbito dorsal em um suporte onde foi registrado o tempo até a recuperação do reflexo de endireitamento, ou tempo de duração do sono, como descrito para o sono induzido por barbitúrico (CARLINI et al., 1986; CARLINI; BURGOS, 1979; CHWEH et al., 1987). O sono ou hipnose foi, portanto, caracterizado pela duração de perda do reflexo postural após a injeção i.c.v. até a recuperação da postura de endireitamento normal (VIEIRA, 2001).

Vale ressaltar que para padronizar o nível de saturação na câmara, cada bola de algodão foi utilizada para apenas 3 animais em sequencia. Após 3 animais, a bola com éter etílico foi substituída e uma nova saturação de 10 min ocorreu.

### 3.1.3.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE consiste de dois braços abertos opostos (30 cm x 5 cm) com uma borda protetora de 0,25 cm de altura, que estão cruzados em ângulo reto com outros dois braços (30 cm x 5 cm) cercados lateralmente por uma parede de 15 cm de altura (braços fechados). Os quatro braços delimitam uma área central de 5 x 5 cm, designada como plataforma central. Todo o aparelho foi confeccionado em acrílico, sendo as paredes dos braços fechados feitos em acrílico transparente e o assoalho em acrílico preto. O aparelho está elevado a 45 cm do nível do chão do laboratório.

A BC, foi administrada apenas nas concentrações com melhores resultados obtidos no protocolo do sono etéreo (0,02; 0,2 e 2 pmol/2µl, i.c.v.). As flavonas 6-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, 6,7-dihidroxiflavona, 6-metoxiflavona, 7,8-dihidroxiflavona e 5,7-dihidroxiflavona foram testadas nas concentrações de 0,02 e 0,2 pmol/2µl, i.c.v. As demais flavonas luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) e apigenina (4',5,7-triidroxiflavona), e os flavonóis galangina (3,5,7-triidroxiflavona) e quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) foram testados apenas na concentração de 0,2 pmol/2µl, i.c.v. Os animais tratados com diazepam (7 nmol/2 µl, i.c.v.) serviram como grupo controle positivo.

Como procedimento geral, os camundongos foram tratados com os flavonoides/veículo em estudo e, decorrido 5 min, foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e o seu comportamento observado por 5 min. A avaliação dos parâmetros comportamentais ocorreu em uma sala com luz vermelha, sendo a luminosidade no centro dos braços de 2 lux e, após o teste de cada animal, o LCE foi limpo com solução etanol 10% e seco com papel toalha (PELLOW et al., 1985; RODGERS et al., 1997).

As medidas comportamentais registradas no LCE foram as descritas a seguir. As porcentagens de entradas e de tempo despendido nos braços abertos foram obtidas, respectivamente, pela relação entre: o número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos, dividido pelo número total de entradas e tempo total despendido nos braços do LCE x 100. O número de entradas nos braços fechados e o número total de entradas nos braços foram registrados como índices de atividade locomotora (LISTER, 1987). Foram também registradas medidas de avaliação etológica como o número de imersões de cabeça, postura de avaliação de risco ou estiramentos corporais, comportamento de levantar e comportamento de autolimpeza (RODGERS et al., 1997). Foi considerado como entrada em um dos braços do labirinto, quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço, e como saída quando saiu com as quatro patas. O comportamento de imersão de cabeça foi registrado quando o animal explorava a área abaixo da plataforma do LCE, apenas quando ocorreu fora dos braços fechados, denominado de imersão desprotegida. A avaliação de risco ou estiramentos corporais foi registrada quando o animal, mantendo as patas traseiras fixas no chão do aparelho, estirava os membros dianteiros e retornava a posição inicial, apenas quando este comportamento ocorreu dentro dos braços fechados, chamado estiramento corporal protegido. Entendeu-se por comportamento de levantar a manutenção do corpo apenas com as patas traseira no chão do LCE, e as patas dianteiras apoiadas ou não na parede do aparelho. Quando o camundongo lambeu seus membros ou pelos de qualquer área corporal, este comportamento foi registrado como atividade de autolimpeza.

### 3.1.3.3 Placa perfurada (PP)

Introduzido inicialmente por Boissier e Simon (1962, 1964 apud TAKEDA et al., 1998), o teste da placa perfurada em nosso laboratório é constituído de uma caixa (40 cm x 40 cm x 15 cm), aberta

na parte superior, com acrílico preto no chão e, acrílico transparente nas paredes. O aparelho está suspenso a 10 cm do chão e seu piso está dividido em 16 quadrantes, sendo que cada quadrante possui um orifício central de 2,3 cm de diâmetro, totalizando 16 orifícios.

A BC foi administrada nas mesmas concentrações usadas do teste do labirinto em cruz-elevado: 0,02; 0,2 e 2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v. O diazepam, na concentração de 7 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v., constituiu o grupo controle positivo.

Os animais foram tratados com BC/veículo e 5 min após, colocados no centro do aparelho e o seu comportamento observado por 5 min. A avaliação dos parâmetros comportamentais ocorreu em uma sala com luz vermelha, sendo a luminosidade no centro do aparelho de 2 lux. Após o teste de cada animal, o aparelho foi limpo com solução de etanol a 10% e seco com papel toalha.

As medidas comportamentais, observadas no teste da placa perfurada, estão descritas a seguir. Foi registrado o tempo desde a colocação no centro do aparelho até a primeira exploração de um orifício, denominado latência para a primeira imersão de cabeça; o número de vezes em que o animal explorava a área abaixo da placa, denominado imersões de cabeça, índice de atividade ansiolítica; o número de cruzamentos entre os quadrantes do aparelho; e o número de levantamentos, sendo considerado levantamento quando o animal elevava as patas dianteiras e mantinha o corpo apoiado apenas com as patas traseiras no chão do aparelho, apoiado ou não nas paredes laterais do equipamento. Fármacos ansiolíticos tendem a aumentar o número de explorações nos orifícios, índice de atividade exploratória, enquanto fármacos ansiogênicos ou fármacos em doses sedativas tendem a reduzir esta exploração (FILE; PELLOW, 1985; TAKEDA et al., 1998).

#### 3.1.3.4 Convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)

Os camundongos foram inicialmente tratados com a BC, nas concentrações de 0,02; 0,2; 2 e 20 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v., ou veículo, ou controle positivo (diazepam – 21 nmol/2  $\mu$ l), pela via i.c.v. e, 5 min. após foram tratados com pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.) e mantidos individualmente em caixas plásticas (40 cm x 30 cm x 15 cm) para observação das convulsões. Durante os 30 min após a administração do PTZ, os animais foram observados para registro do tempo para manifestação da primeira convulsão (latência), assim como a duração desta convulsão (duração da primeira convulsão) e o número e grau de

severidade das convulsões, avaliados com o escore de severidade (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988; SWINYARD et al., 1952; SWINYARD et al., 1989). Para o escore de severidade, consideramos a escala proposta por Czuczwar e Frey (1986), como ilustra o quadro abaixo (Quadro 1). Animais que apresentaram *status epilepticus*, caracterizado por longo tempo de convulsão persistente do tipo convulsão tônico-clônica, sem recuperação de reflexo postural e consciência, foram registrados como apresentando grau de severidade 5, como sugerido por Ilhan e col. (2004).

**Quadro 1** - Escala de severidade atribuída ao comportamento apresentado no teste das convulsões induzidas por PTZ.

Comportamento Apresentado	Grau de Severidade
Nenhum comportamento convulsivo	0
Abalos mioclônicos	1
Crises clônicas sem perda de reflexo de endireitamento	2
Crises clônicas com perda de reflexo de endireitamento	3
Extensão tônica das patas posteriores	4
Extensão tônica seguida de morte	5
<i>Status epilepticus</i>	5

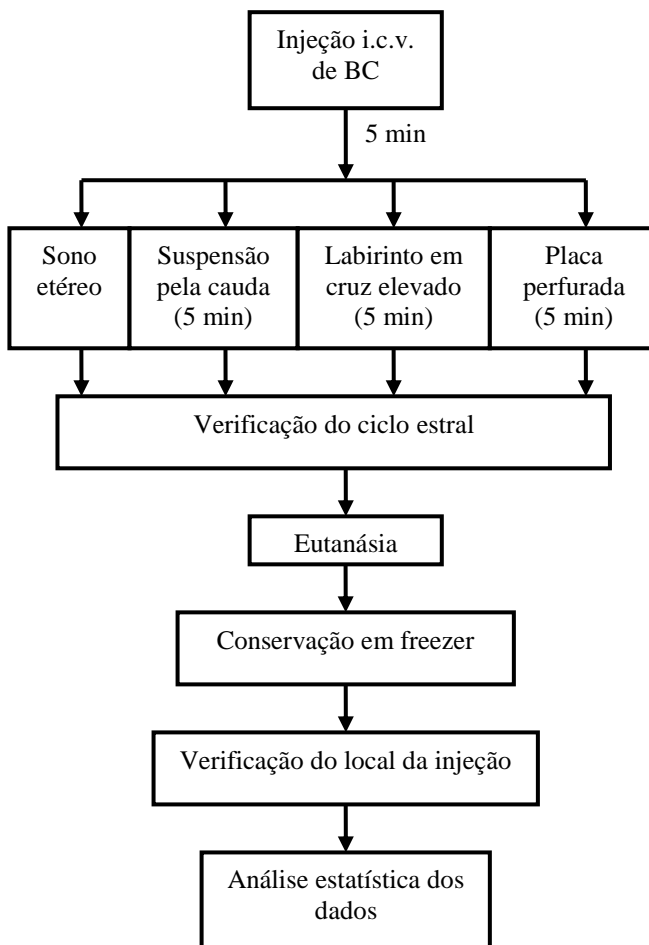
### 3.1.3.5 Teste de suspensão pela cauda (TST)

O TST, utilizado para identificar fármacos com possível efeito tipo-antidepressivo, foi realizado conforme descrito por Steru e colaboradores (1985). Os camundongos foram tratados com a BC, nas concentrações de 0,02; 0,2; 2 e 20 pmol/2 µl, i.c.v., ou veículo pela mesma via e, 5 min após, presos com fita adesiva pelo terço final da cauda, a uma superfície, a 50 cm do chão e distante por pelo menos 30 cm de qualquer objeto, onde permaneceram por 5 min. Neste período de observação foram registrados: o tempo decorrido desde a fixação do animal até a primeira imobilidade (latência) e somados os intervalos de tempo em que o animal permaneceu imóvel (duração da imobilidade), em segundos (s). A imipramina, na dose de 15 mg/kg i.p., 30 min antes dos testes experimentais, foi usada como controle positivo.

### 3.1.3.6 Esquemas para procedimentos experimentais

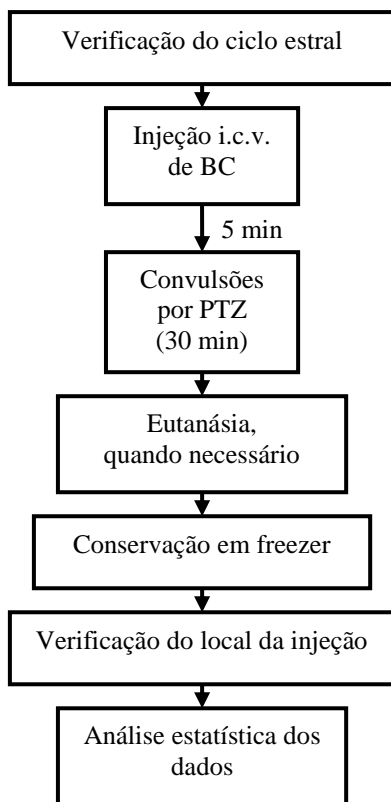
Os esquemas seguintes resumem a sequência de eventos durante cada experimento (Esquema 1 e Esquema 2).

### ESQUEMA 1





## ESQUEMA 2

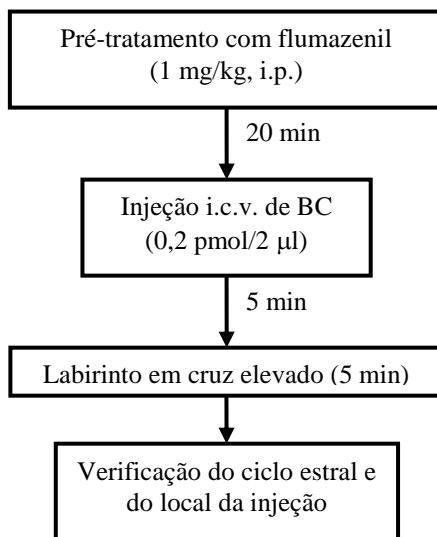
**3.1.4 Estudo do mecanismo de ação da baicaleína****3.1.4.1 Interação com o sistema GABAérgico-benzodiazepínico.**

Utilizamos os protocolos que se seguem para investigar uma possível interação da BC com esses sítios.

#### 3.1.4.1.1 Pré-tratamento com o flumazenil (FMZ)

O FMZ é conhecido como o antagonista clássico no sítio benzodiazepínico-GABAérgico (MÖHLER; RICHARDS, 1981). Ensaios prévios, em nosso laboratório, mostraram que a dose de 1 mg/kg, i.p., foi mais eficiente em antagonizar os parâmetros indicativos de efeito tipo-ansiolítico do DZP e ao mesmo tempo ser desprovida de efeito *per se* (dados não apresentados). Para este protocolo, os animais foram pré-tratados com o FMZ/veículo e, 20 min depois foram tratados com BC (baicaleína - 0,2 pmol/2 µl, i.c.v.) na concentração que produziu efeito do tipo-ansiolítico ou veículo. Após 5 min, os animais foram submetidos ao teste comportamental do labirinto em cruz elevado (LCE) (Esquema 3).

ESQUEMA 3

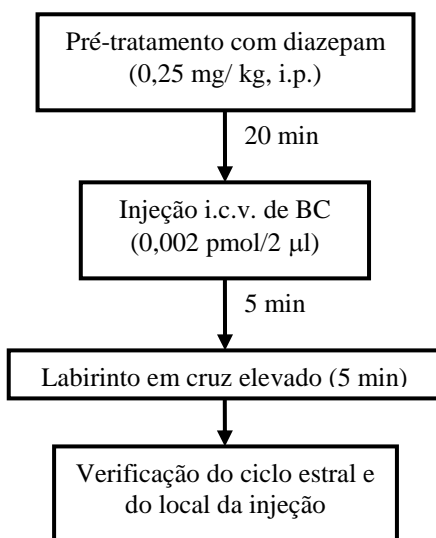


#### 3.1.4.1.2 Pré-tratamento com o diazepam (DZP)

No intuito de investigar o sinergismo entre DZP, um conhecido ligante do sítio benzodiazepínico (DALVI; RODGERS, 1999), e a BC,

os animais foram pré-tratados com diazepam/controle, numa concentração inferior àquela que produziu efeito em ensaios prévios de atividade ansiolítica em nosso laboratório (0,25 mg/kg, i.p.). Após 20 min, foi administrado o veículo ou BC, em concentrações inferiores às que produziram efeito do tipo-ansiolítico (baicaleína - 0,002 pmol/ 2 µl, i.c.v.) e, 5 min após, os animais foram submetidos ao teste comportamental do LCE (Esquema 4).

ESQUEMA 4



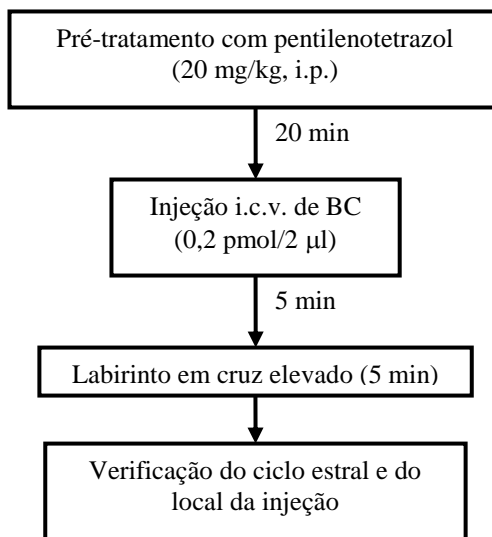
### 3.1.4.2 Interação com o sistema Gabaérgico não-benzodiazepínico

#### 3.1.4.2.1 Pré-tratamento com o pentilenotetrazol (PTZ)

O PTZ, ligante alostérico do complexo GABA<sub>A</sub>, atua em um sítio próximo ao da picrotoxina, porém em um domínio de interação diferente (HUANG et al., 2001). Este composto foi utilizado na dose de 20 mg/kg, i.p., na tentativa de antagonizar o efeito do tipo ansiolítico da BC. O PTZ (ou seu controle) foi administrado 20 min antes do

tratamento com a BC/veículo (0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.). Após 5 min, os animais foram submetidos ao teste comportamental do LCE (Esquema 5).

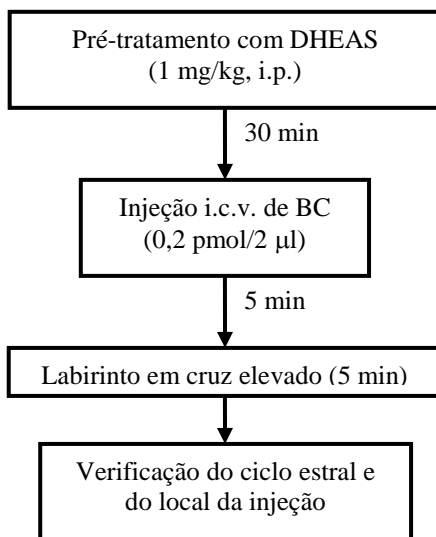
ESQUEMA 5



#### 3.1.4.2.2 Pré-tratamento com a dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS)

A DHEAS, composto modulador do receptor GABA<sub>A</sub>, age em um sítio distinto, o sítio para neuroesteroides (GIBBS et al., 2006), e foi administrada na dose de 1 mg/kg, i.p., na tentativa de antagonizar o efeito tipo-ansiolítico da BC. A DHEAS ou seu controle, foram administrados 30 min antes do tratamento com a BC/veículo, na concentração de 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v. Após 5 min, os animais foram submetidos ao teste comportamental do LCE (Esquema 6).

## ESQUEMA 6

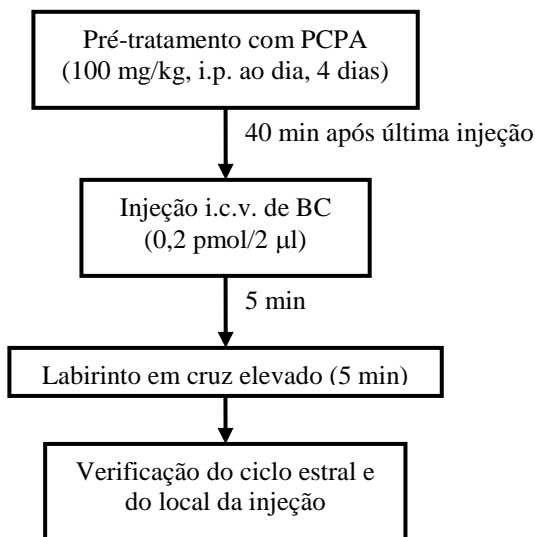


#### 3.1.4.3 Interação com o sistema serotoninérgico – Pré-tratamento com PCPA

Evidências sustentam o envolvimento do sistema serotoninérgico na modulação da ansiedade (GRAEFF, 2002), razão pela qual investigamos a participação deste sistema com o efeito tipo-ansiolítico da BC.

A síntese de serotonina foi bloqueada pelo tratamento com dl-p-clorofenilalanina etiléster (PCPA). A PCPA, em tratamento repetido, inibe a produção de serotonina no cérebro de ratos para níveis de aproximadamente 12% (TENEN, 1967). Nesse protocolo foi utilizada a dose de 100 mg/kg, i.p., durante 4 dias consecutivos. No quarto e último dia de tratamento com PCPA/veículo, a BC/veículo PBS, foi administrada 40 min após o tratamento com PCPA. Cinco minutos após o tratamento com BC, as animais foram submetidos ao teste comportamental do LCE (Esquema 7).

## ESQUEMA 7

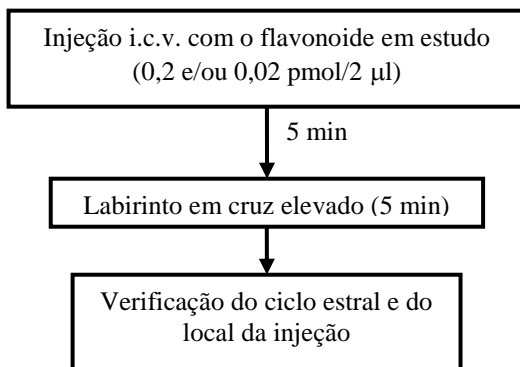


### 3.1.5 Estudo de estrutura-atividade tipo-ansiolítica dos flavonoides estruturalmente relacionados à baicaleína

Os ensaios de estrutura-atividade tipo-ansiolítico foram desenvolvidos apenas no teste do LCE (Esquema 8), e nas duas concentrações onde identificamos resultados do tipo-ansiolítico para a BC. As concentrações escolhidas também foram selecionadas a partir de ensaios preliminares com outros flavonoides (dados não mostrados). Foram selecionados 10 flavonoides de grupo das flavonas e flavonóis, diferentes da BC pelo número e posição de até 2 hidroxilas. Foram eles: 6-hidroxiflavona ( $C_{15}H_{10}O_3$ , PM= 238,26), 7-hidroxiflavona ( $C_{15}H_{10}O_3$ , PM= 238,26), 6,7-dihidroxiflavona ( $C_{15}H_{10}O_4$ , PM= 254,22), 6-metoxiflavona ( $C_{16}H_{12}O_3$ , PM= 252,27), 7,8-dihidroxiflavona ( $C_{15}H_{10}O_4$ , PM= 254,22), 5,7-dihidroxiflavona ( $C_{15}H_{10}O_4$ , PM= 254,23), galangina (Sarsyntex) ( $C_{15}H_{10}O_5$ , PM= 270,24), apigenina ( $C_{15}H_{10}O_4$ , PM=270,24), luteolina (Sarsyntex) ( $C_{15}H_{10}O_6$ , PM= 286,24) e quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ , PM= 302,24). Os flavonoides foram gentilmente

cedidos pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, e obtidos das empresas Roth (Alemanha) e Sigma-Aldrich Chemical Co. (Estados Unidos).

### ESQUEMA 8



#### 3.1.5.1 Ensaios bioquímicos de *binding*

Com intuito de compreender melhor os resultados do estudo de estrutura-atividade do tipo-ansiolítica, foi realizado um estudo de *binding* ao sítio BDZ do complexo receptor GABA<sub>A</sub>, apenas para os flavonoides cuja afinidade ao mesmo não havia sido previamente descrita na literatura.

Os flavonoides 7,8-DH, 6,7-DH e GL, foram testados nos ensaios de *binding* até a concentração de 300 µM e, a porcentagem de inibição do *binding* do [<sup>3</sup>H]-FNZ nos receptores BDZ foi determinada. Estes ensaios foram realizados pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariel Marder, no Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas da Facultad de Farmacia y Bioquímica na Universidad de Buenos Aires, Argentina.

De forma resumida o *binding* de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam ([<sup>3</sup>H]-FNZ) (81.8 Ci/mmol; obtido de Perkin-Elmer Life e Analytical Sciences, Boston, MA, USA) ao sítio de *binding* benzodiazepínico em membranas de sinaptossomas de córtex cerebral de rato foi determinado conforme descrito em detalhes por Marder e colaboradores (2003). Em ensaios competitivos, a incubação foi realizada com 0,42 nM de [<sup>3</sup>H]-FNZ na

presença dos compostos. O *binding* não-específico foi mensurado na presença de FNZ (10  $\mu$ M) e representou 5-15% do total do *binding*. Após a incubação, o ensaio foi finalizado com a filtração em vácuo através de filtros de fibra de vidro Whatman GF/B, seguido de três lavagens com 3 mL com cada meio de incubação. Os filtros foram incubados *overnight* com um cocktail de cintilação (OptiPhase 'HiSafe' 3) antes da mensuração de radioatividade em um contador de cintilação líquida Wallac Rackbeta 1214. Os dados gráficos foram representados como a porcentagem de ligação específica de [ $^3$ H]-FNZ, na ordenada, em função do logaritmo de concentrações crescentes do inibidor (flavonoide testado) na abscissa. Os valores de  $K_i$  foram obtidos pela equação de Cheng-Prusoff (CHENG, PRUSOFF, 1973 apud CHENG, 2002):  $K_i = CI_{50}/(1+[concentração\ do\ radioligante]/K_d)$ , onde  $CI_{50}$  é a concentração inibitória 50% do flavonoide e,  $K_d$  é a afinidade do radioligante ao receptor (2 nM).

### 3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo *software* Statistica® versão 7.0 e os gráficos confeccionados no GraphPad® versão 5.0. Os dados obtidos em cada experimento foram expressos como média + E.P.M. ou mediana e intervalo interquartil. Um número de 8 a 10 animais foi utilizado para cada grupo.

Para os ensaios de estudo de atividade farmacológica, em todas as análises, o controle positivo foi comparado ao grupo controle pelo teste t, quando as variáveis eram paramétricas (com distribuição normal); e pelo teste U de Mann-Whitney, quando as variáveis eram não paramétricas (sem distribuição normal).

Para comparação entre os grupos tratados (duas concentrações ou mais) e controle, optou-se por utilizar ANOVA de uma via, seguida do testes de Dunnett, nas variáveis paramétricas. Nas medidas não paramétricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica), seguido do teste das comparações múltiplas.

Nos estudos onde havia apenas um grupo tratado (uma concentração), foi utilizado o teste t, quando as variáveis eram paramétricas; e o teste U de Mann-Whitney, quando as variáveis eram não paramétricas.

Para todos os ensaios com antagonistas foi utilizado o teste ANOVA de duas vias, como intuito de verificar o efeito do pré-tratamento sobre o tratamento, sendo seguido do teste de Newman-



Keuls. As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p$  foi menor que 0,05.

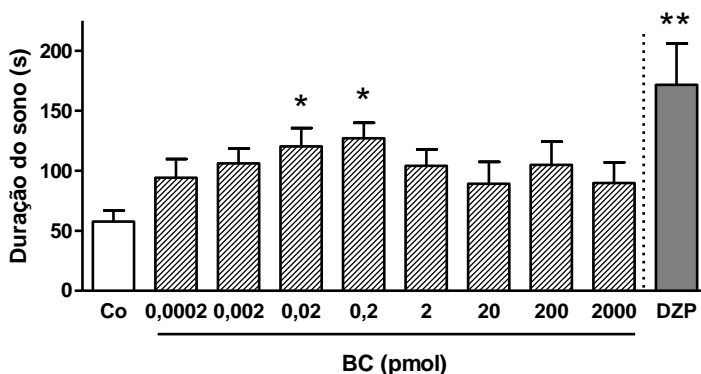
## 4 RESULTADOS

### 4.1 ATIVIDADE HIPNO-SEDATIVA

#### 4.1.1 Sono induzido por éter etílico

Para investigar o possível efeito hipno-sedativo da BC, procedeu-se o estudo da curva concentração-resposta no teste da hipnose induzida por éter etílico.

Todos os tratamentos promoveram aumento do tempo de sono, no entanto, apenas as concentrações de 0,02 e 0,2 pmol o fizeram de forma significativa ( $F(8, 77)=1,8021$ ,  $p=0,08944$ ; ANOVA), aumentando o tempo em 108 e 120%, respectivamente ( $p=0,0247$  e  $p=0,0126$ ; teste Dunnett) (Figura 5). O grupo controle, DZP (diazepam – 11 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v.), conforme esperado, promoveu um efeito hipno-sedativo, aumentando o tempo de sono em 197% ( $p=0,004987$ ; teste t; Figura 5).



**Figura 5** - Duração do sono induzido por éter etílico em camundongos, após a administração de BC (baicaleína - pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.), no teste da hipnose induzida por éter etílico. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  quando comparado ao grupo controle – Co; ANOVA de uma via seguida pelo teste Dunnett para os grupos tratados e teste t para o controle positivo diazepam – DZP, 11 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v.).

## 4.2 ATIVIDADE TIPO-ANSIOLÍTICA

### 4.2.1 Labirinto em cruz elevado

As concentrações que apresentaram efeito hipnosedativo no teste da hipnose induzida por éter etílico e uma terceira concentração foram testadas no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), uma vez que a atividade hipno-sedativa pode estar associada à atividade ansiolítica, principalmente quando se considera a modulação pelo sistema GABAérgico (MÖHLER et al., 2004)

Como observado na figura 6, com relação aos parâmetros clássicos, a BC na concentração de 0,02 pmol e 0,2 pmol, aumentou as entradas nos braços abertos (EA) de forma significativa ( $F(3,34)=4,2503$ ;  $p=0,012$ , sendo  $p=0,021$ ,  $p=0,041$ , respectivamente; teste Dunnett), em 124 e 109% dos valores controles (Figura 6A). O tempo despendido nos braços abertos foi aumentado 257% pelo tratamento com a BC ( $F(3,34)=3,0169$ ,  $p=0,043$ ), apenas na concentração de 0,02 pmol ( $p=0,044$ , teste Dunnett). A concentração de 0,2 pmol também aumentou o tempo nos braços abertos em 8%, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo ( $p=0,076$ , teste Dunnett) (Figura 6B).

Nenhuma das concentrações aqui estudadas interferiu com as entradas nos braços fechados (EF) ( $p>0,05$ ), embora a concentração de 0,02 pmol tenha reduzido este parâmetro em 55,5% (Figura 6C).

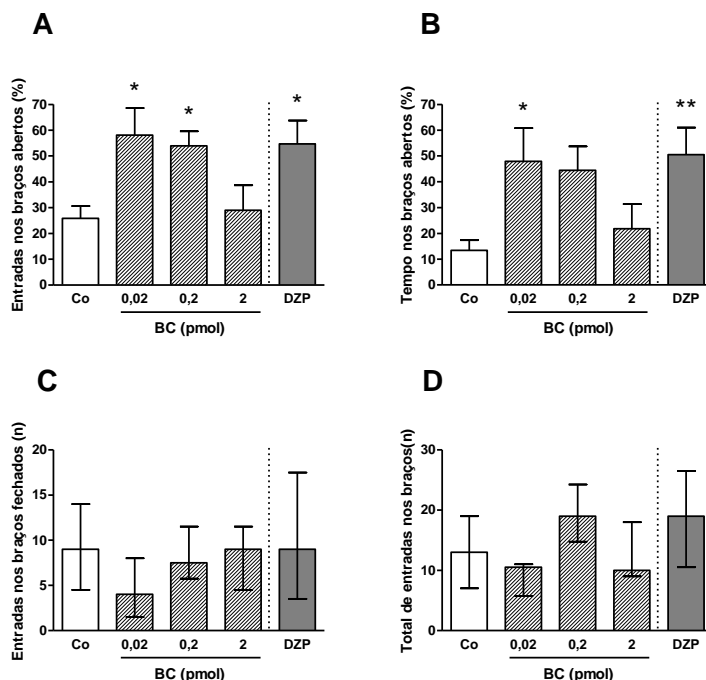
O número total de entradas (TE) não foi afetado pelo tratamento com a BC, em todas as concentrações testadas ( $p>0,05$ , ANOVA) (Figura 6D).

Com relação aos parâmetros comportamentais etológicos, houve diferença significativa entre os tratamentos no parâmetro de estiramentos corporais (SAP) (Figura 7A) ( $H(3, N=38)=11,26$ ,  $p=0,0104$ ) que foi reduzido significativamente em 100% pela BC na concentração de 0,2 pmol ( $p=0,033$ , comparações múltiplas). Houve também diferença nas imersões de cabeça ( $H(3, N=38)=10,91$ ,  $p=0,0122$ ), onde a mesma concentração promoveu aumento de 6 vezes nesta medida ( $p=0,0094$ ) (Figura 7B).

Os comportamentos de levantar (REA) e autolimpeza (GRO) não foram significativamente modificados pelo tratamento com a BC nas concentrações testadas, embora a concentração de 0,02 pmol tenha reduzido ambos os comportamentos em 50% (Figura 7C e 7D).

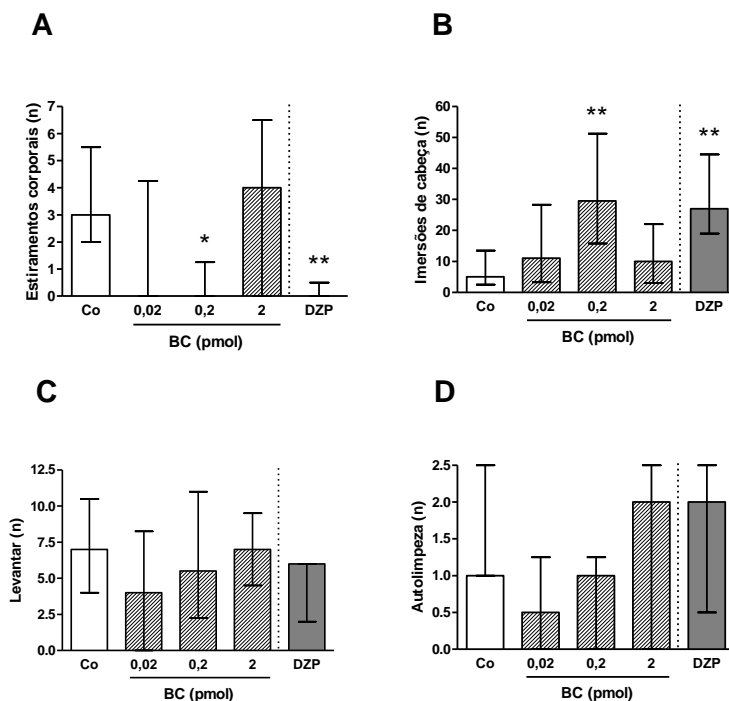
O DZP, conforme esperado para o controle positivo, aumentou as entradas ( $p=0,012$ ; teste t), e o tempo nos braços abertos ( $p=0,0046$ ;

teste t), sem interferir com as entradas nos braços fechados e o total de entradas ( $p>0,05$ ; teste U de Mann-Whitney) (Figura 6). Houve também uma redução nos estiramentos ( $p=0,0036$ ; teste U de Mann-Whitney) e um aumento nas imersões de cabeça ( $p=0,0013$ ; teste U de Mann-Whitney), sem interferir com os comportamentos de levantar ou autolimpeza ( $p>0,05$ ; teste U de Mann-Whitney) (Figura 7).



**Figura 6** - Efeito do tratamento de camundongos com a BC (baicaleína - pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) no teste do labirinto em cruz elevado, durante 5 min. A) entradas nos braços abertos; B) tempo nos braços abertos; C) entradas nos braços fechados; e D) total de entradas nos braços. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. ou a mediana e o intervalo interquartil. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  quando comparado ao grupo controle – Co; ANOVA de uma via seguida pelo teste Dunnett; ou Kruskal-Wallis seguido do teste das Comparações múltiplas. Para o controle positivo diazepam – DZP – na concentração de 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v., foi utilizado o teste t, ou teste U de Mann-

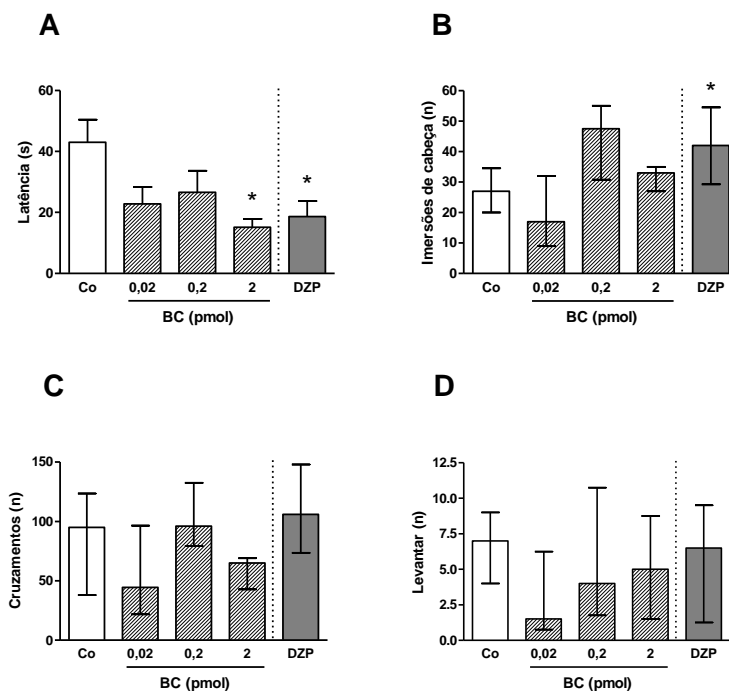
Whitney, respectivamente para medidas paramétricas e não paramétricas).



**Figura 7** - Efeito do tratamento de camundongos com a BC (baicaleína - pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.), no teste do labirinto em cruz elevado, durante 5 min. A) estiramientos corporais; B) imersões de cabeça; C) comportamentos de levantar; e D) comportamentos de autolimpeza. Cada coluna representa a mediana e o intervalo interquartil. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle – Co; Kruskal-Wallis seguido do teste das Comparações múltiplas. Para o controle positivo diazepam – DZP – na concentração de 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v., foi utilizado o teste U de Mann-Whitney).

#### 4.2.2 Placa perfurada (PP)

Conforme realizado para os demais testes, foi feita uma curva concentração-resposta para a baicaleína no teste da placa perfurada, utilizando as mesmas concentrações usadas do teste do LCE. No parâmetro latência para a primeira imersão de cabeça, o teste ANOVA mostrou haver diferença entre os tratamentos ( $F=(3,33)=3,3931$ ,  $p=0,02927$ ; ANOVA) (Figura 8A). A latência para a primeira imersão de cabeça foi reduzida de forma significativa em 43% no grupo controle positivo diazepam e 35% no grupo tratado com BC na concentração de 2 pmol. No tocante às imersões de cabeça, houve diferença estatística entre os tratamentos ( $H(3, N=37)=11,297$ ,  $p=0,012$ ; Kruskal-Wallis) sendo a diferença significativa observada entre o grupo tratado com 0,2 pmol e tratado com 0,02 pmol de BC ( $p=0,007$ , teste das Comparações múltiplas) (Figura 8B). Não houve, no entanto, diferença significativa entre a concentração de 0,2 pmol e o grupo controle, embora tenha ocorrido um aumento de 79% nas imersões de cabeça. Tanto os cruzamentos, como o comportamento de levantar, não foram alterados por nenhum dos tratamentos ( $p>0,05$ ) (Figura 8C e 8D).



**Figura 8** - Efeito do tratamento de camundongos com a BC (baicaleína - pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) no teste da placa perfurada, durante 5 min. A) latência para a primeira imersão de cabeça; B) número de imersões de cabeça; C) cruzamentos; e D) comportamentos de levantar. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. ou a mediana e o intervalo interquartil. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle – Co, ANOVA de uma via seguida pelo teste Dunnett; ou Kruskal-Wallis seguido do teste das Comparações múltiplas. Para o controle positivo DZP – diazepam 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v. – foi utilizado o teste t, ou teste U de Mann-Whitney, respectivamente para medidas paramétricas e não paramétricas).

### 4.3 ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE

#### 4.3.1 Convulsões induzidas por PTZ

Com o intuito de investigar uma possível atividade anticonvulsivante, foi construída uma curva concentração-efeito com quatro concentrações da BC no teste das convulsões induzidas por PTZ.

Nenhuma das concentrações da BC foi capaz de interferir de forma significativa com a latência para a primeira convulsão, duração desta convulsão ou severidade das convulsões ( $p > 0,05$ ; ANOVA ou Kruskal-Wallis) (Tabela 1). No entanto, a concentração de 0,2 pmol promoveu aumento de 4 vezes na latência para a primeira convulsão. O controle positivo diazepam foi capaz de elevar em 5 vezes a latência para a primeira convulsão ( $p = 0,039$ ; teste t). Além disso, o DZP reduziu à metade os escores de severidade das convulsões ( $p = 0,0008$ ; teste U de Mann-Whitney), mostrando um claro efeito anticonvulsivante. Não houve diferença significativa no parâmetro duração da primeira convulsão para o grupo controle positivo ( $p > 0,05$ ; teste t).

**Tabela 1** – Efeito do tratamento com a BC (baicaleína – pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) nos parâmetros comportamentais registrados durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ – 80 mg/kg, i.p.).

Tratamento	Concentração (pmol)	Latência para a primeira convulsão (s)	Duração da Primeira convulsão (s)	Severidade das convulsões (escores)
Co	<sup>a</sup>	143 $\pm$ 25,11	10 $\pm$ 2,6	25,5 (22-36)
BC	0,02	238,1 $\pm$ 75,67	7,67 $\pm$ 1,75	36 (32-39)
	0,2	525,3 $\pm$ 241,7	9 $\pm$ 2,02	36 (29-41)
	2	157,3 $\pm$ 18,93	8,89 $\pm$ 1,89	34 (21-60)
	20	225,56 $\pm$ 100	11,89 $\pm$ 3,09	29 (21-40)
DZP	<sup>b</sup>	582,4 $\pm$ 196,6*	12,4 $\pm$ 2,55	11,5 (8-15)**

<sup>a</sup> Co (veículo DMSO 1% em PBS - 2  $\mu$ l, i.c.v.) foi usado como grupo controle. <sup>b</sup> DZP (diazepam - 21 nmol/2 $\mu$ l, i.c.v.) foi usado como controle positivo e comparado com o grupo controle pelo teste t ou teste U de Mann-Whitney. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. ou mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3) de 8-10 animais. (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle; ANOVA seguida do teste Dunnett; ou Kruskal-Wallis seguido do teste das comparações múltiplas).



## 4.4 ATIVIDADE DO TIPO ANTIDEPRESSIVA

### 4.4.1 Teste da suspensão pela cauda

As mesmas concentrações de BC utilizadas nos testes anteriores foram usadas no teste da suspensão pela cauda, para investigar uma possível atividade tipo-antidepressiva.

Nenhum dos tratamentos com BC foi capaz de interferir com a latência ou a duração da imobilidade ( $p > 0,05$ ; ANOVA) (Tabela 2). O controle positivo, IMI (imipramina, 15 mg/kg, i.p.), como esperado, aumentou a latência para a imobilidade em 135% ( $p = 0,003$ ; teste t) e reduziu o tempo de imobilidade 61% ( $p = 0,000$ ; teste t).

**Tabela 2** – Efeito do tratamento com a BC (baicaleína/pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) nos parâmetros comportamentais registrados no teste da suspensão pela cauda.

Tratamento	Concentração (pmol)	Latência para a imobilidade (s)	Duração da imobilidade (s)
Co	<sup>a</sup>	43 $\pm$ 8,95	177,88 $\pm$ 10,21
BC	0,02	43,75 $\pm$ 12,73	168,5 $\pm$ 19,74
	0,2	47,8 $\pm$ 9,08	146,4 $\pm$ 15,55
	2	40 $\pm$ 7,84	177,8 $\pm$ 8,92
	20	50,5 $\pm$ 6,74	172,8 $\pm$ 12,46
IMI	<sup>b</sup>	101,4 $\pm$ 14,26 **	70,2 $\pm$ 9,94**

<sup>a</sup> Co (veículo DMSO 1% em PBS - 2 $\mu$ l, i.c.v.) foi usado como grupo controle. <sup>b</sup> IMI (15 mg/kg, i.p.) foi usado como controle positivo e comparado com o grupo controle pelo teste t. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 8-10 animais. (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle; ANOVA seguida do teste Dunnett).

## 4.5 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BAICALEÍNA

Objetivando investigar o mecanismo de ação da BC, pela via i.c.v., a concentração de 0,2 pmol, que apresentou resultados significativos do tipo-ansiolítico sem qualquer efeito sedativo, nos testes de farmacologia central, foi utilizada nos ensaios com moduladores, antagonistas e agonistas dos receptores de interesse.

### 4.5.1 Investigação da atividade GABAérgica-benzodiazepínica

#### 4.5.1.1 Pré-tratamento com o flumazenil

##### 4.5.1.1.1 Teste do labirinto em cruz-elevado

Em experimentos prévios em nosso laboratório foi obtida uma curva dose-resposta com o FMZ (ver apêndice B). A melhor dose (1 mg/kg, i.p.) foi selecionada para o teste do labirinto em cruz elevado, a qual, utilizada como pré-tratamento, não promoveu efeito *per se* em nenhum dos parâmetros analisados ( $p>0,05$ ) (ver apêndice C).

Para possibilitar a comparação com um benzodiazepínico clássico, usamos o flumazenil na mesma dose para antagonizar o efeito ansiolítico do DZP (diazepam - 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v.), no teste do labirinto em cruz.

No parâmetro entradas nos braços abertos, houve diferença significativa entre os tratamentos ( $F(1, 30)=15,48$ ,  $p=0,00046$ ) (Figura 9A). A BC promoveu um aumento de 100% ( $p=0,038$ ) nas entradas nos braços abertos. Este efeito não foi alterado pelo pré-tratamento com FMZ ( $p>0,05$ ). Da mesma forma, houve diferença entre os tratamentos no parâmetro tempo nos braços abertos ( $F(1, 30)=17,48$ ,  $p=0,00023$ ), onde o aumento promovido pela BC ( $p=0,03$ ) não foi antagonizado pelo FMZ (Figura 9C).

Como observado para a BC, o FMZ não modificou os parâmetros clássicos nos animais tratados com DZP (Figura 9B e 9D). O aumento não significativo de 100% promovido pelo DZP foi reduzido em 18%, mas as diferenças não alcançaram significância. No parâmetro tempo despendido nos braços abertos houve diferença entre tratamentos ( $F(1, 27)=12,47$ ,  $p=0,0015$ ) ( $p=0,010$ ), sendo que o grupo DZP permaneceu em torno de 60% do tempo nestes braços. O pré-tratamento com FMZ reduziu essa permanência em 36% de modo não significativo estatisticamente.

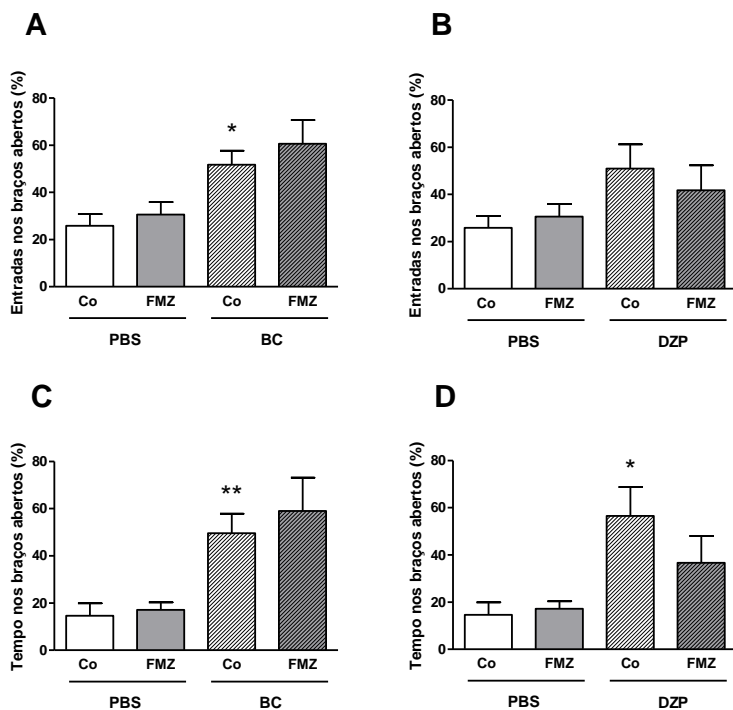
Nas entradas nos braços fechados, não houve diferenças significativas entre pré-tratamentos ou tratamentos ( $p>0,05$ ) (Figura 10). Entretanto, houve interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento ( $F(1, 30)=10,98$ ,  $p=0,00241$ ) e grupo pré-tratado com FMZ e tratado com BC, mostrando que o pré-tratamento reduziu em 70% o número de entradas nos braços fechados (Figura 10A). O número total de entradas nos braços também foi afetado pelo pré-tratamento ( $F(1, 30)=5,19$ ,  $p=0,029$ ) assim como o fator interação ( $F(1, 30)=18,032$ ,  $p=0,00019$ ). A BC aumentou o total de entradas ( $p=0,0033$ ) em 100% e o pré-tratamento com o FMZ bloqueou totalmente este efeito (Figura 10C).

Com relação às entradas nos braços fechados e o total de entradas, o tratamento com DZP não modificou significativamente esses comportamentos, embora eleve em 100% o total de entradas. O pré-tratamento com FMZ não alterou nenhum dos parâmetros (Figura 10B e 10D).

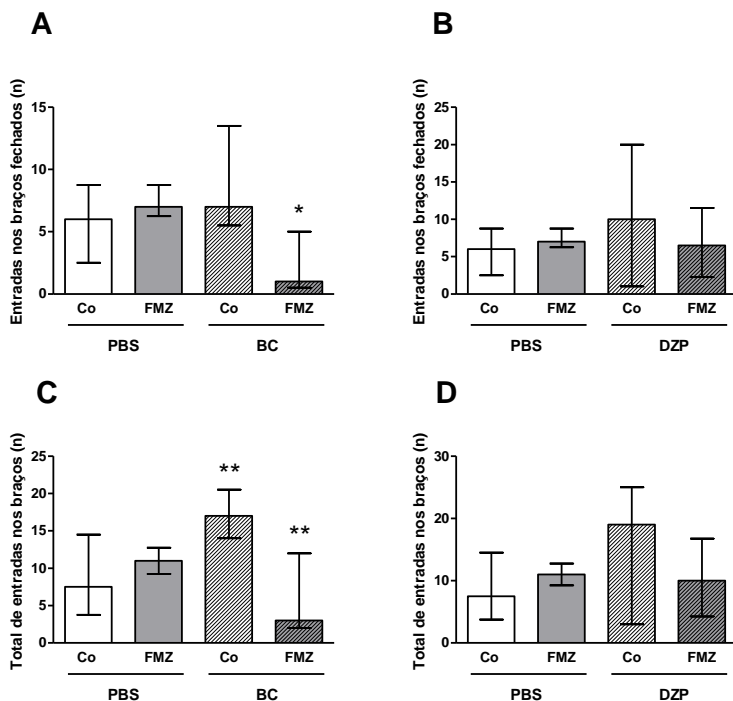
Com relação aos parâmetros etológicos, os estiramentos corporais não foram modificados ( $p>0,05$ ) (Figura 11). As imersões de cabeça, por outro lado, foram aumentadas em 5 vezes pelo tratamento com a BC ( $F(1, 30)=37,26$ ,  $p=0,0000$ ) ( $p=0,00016$ ) (Figura 11C). Houve interação entre pré-tratamento e tratamento ( $F(1, 30)=5,75$ ,  $p=0,022$ ), e o pré-tratamento com FMZ reduziu esse aumento em 40% ( $p=0,0066$ ), mas não o aboliu totalmente (Co+PBS x BC+FMZ;  $p=0,011$ ). Os comportamentos de levantar e de autolimpeza não foram modificados por nenhum dos tratamentos ( $p>0,05$ , ANOVA) (Figura 12A e 12C).

Dos parâmetros não convencionais etológicos, os estiramentos corporais não foram modificados de forma significativa pelo DZP, embora tenham sido drasticamente reduzidos em 94% (Figura 11B).

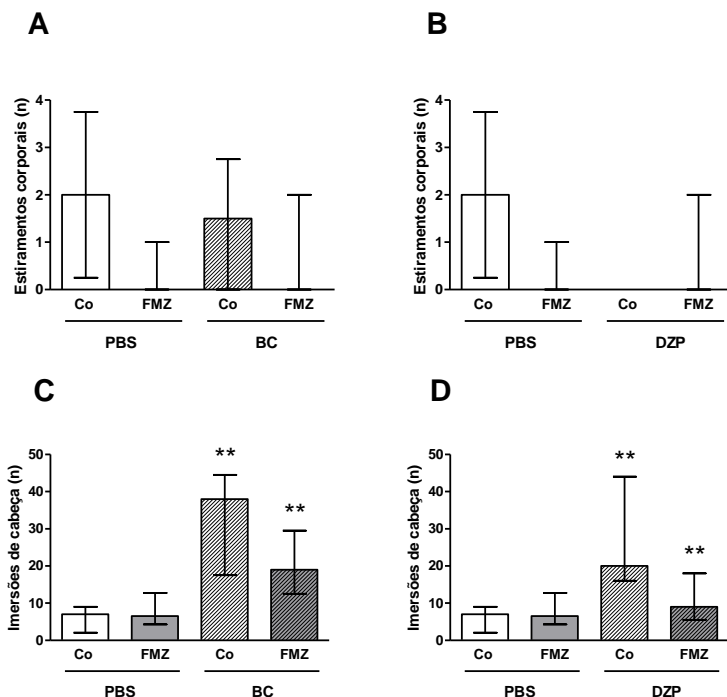
Para o comportamento imersões de cabeça, foi observada diferença entre os tratamentos ( $F(1,27)=13,93$ ,  $p=0,00089$ ) e no fator interação ( $F(1,27)=6,56$ ,  $p=0,01633$ ) (Figura 11D). O DZP aumentou as imersões de cabeça três vezes ( $p=0,00085$ ) e o pré-tratamento com FMZ reduziu este aumento à metade ( $p=0,0038$ ). Assim como observado para a BC os comportamentos de levantar e de autolimpeza não foram modificados por nenhum dos tratamentos ( $p>0,05$ , ANOVA) (Figura 12B e 12D).



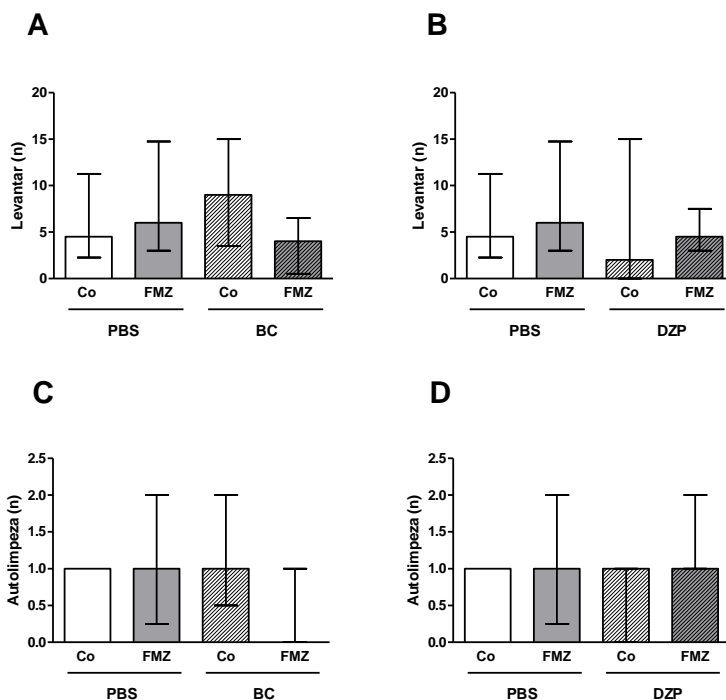
**Figura 9** - Influência do pré-tratamento com o FMZ (1 mg/kg, i.p.) nas entradas e de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, induzidos pela administração central de BC (baicaleína - 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v) e de DZP (diazepam - 7 nmol/ 2  $\mu$ l, i.c.v.). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao respectivo grupo controle - Co; ou Co+PBS x Co+BC ou x Co+DZP; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).



**Figura 10** - Influência do pré-tratamento com o FMZ (1 mg/kg, i.p.) nas entradas nos braços fechados e no número total de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado, induzidos pela administração central de BC (baicaleína - 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v) e de DZP (diazepam - 7 nmol/ 2  $\mu$ l, i.c.v.). Cada coluna representa a mediana dos resultados obtidos e intervalo interquartil (Q1-Q3). O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao respectivo grupo controle - Co; ou Co+PBS x Co+BC ou x Co+DZP; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).



**Figura 11** - Influência do pré-tratamento com o FMZ (1 mg/kg, i.p.) no número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça no labirinto em cruz elevado, induzidos pela administração central de BC (baicaleína - 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) e de DZP (diazepam - 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v.). Cada coluna representa a mediana dos resultados obtidos e intervalo interquartil (Q1-Q3). O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao respectivo grupo controle – Co; ou Co+PBS x Co+BC ou x Co+DZP; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).



**Figura 12** - Influência do pré-tratamento com o FMZ (1 mg/kg, i.p.) no número de levantamentos e de autolimpeza no labirinto em cruz elevado, induzidos pela administração central de BC (baicaleína - 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) e de DZP (diazepam - 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v.). Cada coluna representa a mediana dos resultados obtidos e intervalo interquartil (Q1-Q3). O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao respectivo grupo controle – Co; ou Co+PBS x Co+BC ou x Co+DZP; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).

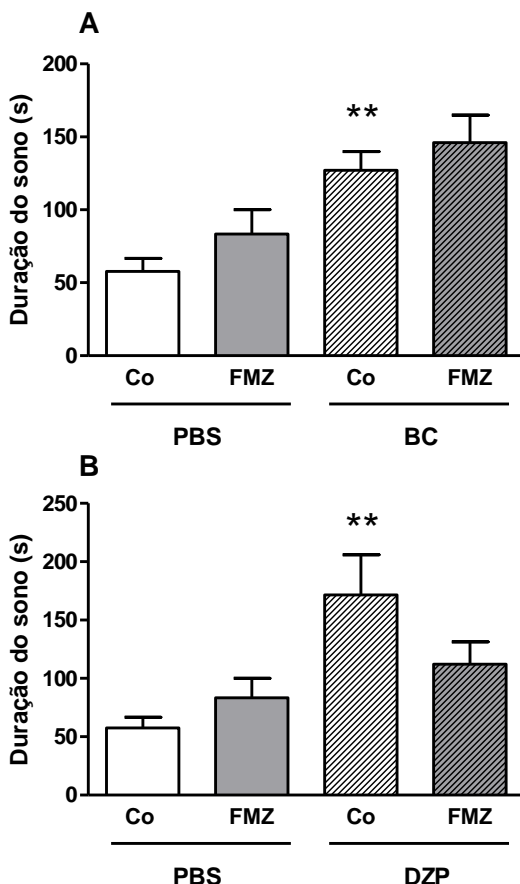
#### 4.5.1.1.2 Teste do sono etéreo

Com o objetivo de confirmar alguns resultados sobre os efeitos hipnosedativos observados no estudo da interação de FMZ e BC no teste do labirinto em cruz elevado, optamos por verificar se o FMZ poderia também modificar o efeito hipnosedativo da BC no teste de sono induzido pelo éter etílico. Para melhorar a compreensão dos resultados, testamos também o efeito do pré-tratamento com o FMZ sobre o efeito do DZP no mesmo teste.

Como observado na figura 13A, o tratamento com BC, aumentou a duração do sono em 120% ( $F(1, 33)=19,51$ ,  $p=0,0001$ ) ( $p=0,0068$ , Newman-Keuls). O pré-tratamento com o FMZ aumentou o tempo de sono da BC em 14%, sem atingir significância estatística, quando comparado ao grupo Co+BC ( $p>0,05$ ). O efeito hipno-sedativo da BC não foi antagonizado pelo tratamento com o FMZ.

No experimento paralelo, realizado como o diazepam (DZP – 11 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v.), houve diferença entre os tratamentos ( $F(1, 34)=9,99$ ,  $p=0,003$ ), mostrando que o DZP foi capaz de aumentar a duração do sono em quase 3 vezes ( $p=0,0058$ , Newman-Keuls). O pré-tratamento com flumazenil não promoveu efeito *per se* ( $p>0,05$ ). Embora tenha reduzido à metade o efeito hipno-sedativo do DZP, não o fez de forma significativa ( $p=0,071$ ) (Figura 13B).





**Figura 13** - Influência do pré-tratamento com o FMZ (1 mg/kg, i.p.) na atividade hipno-sedativa induzida pela administração central de BC (baicaleína - 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) e DZP (diazepam - 11 nmol/ 2  $\mu$ l, i.c.v.) avaliada no teste do sono induzido por éter etílico. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao respectivo grupo controle - Co; ou Co+PBS x Co+BC ou x Co+DZP; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).

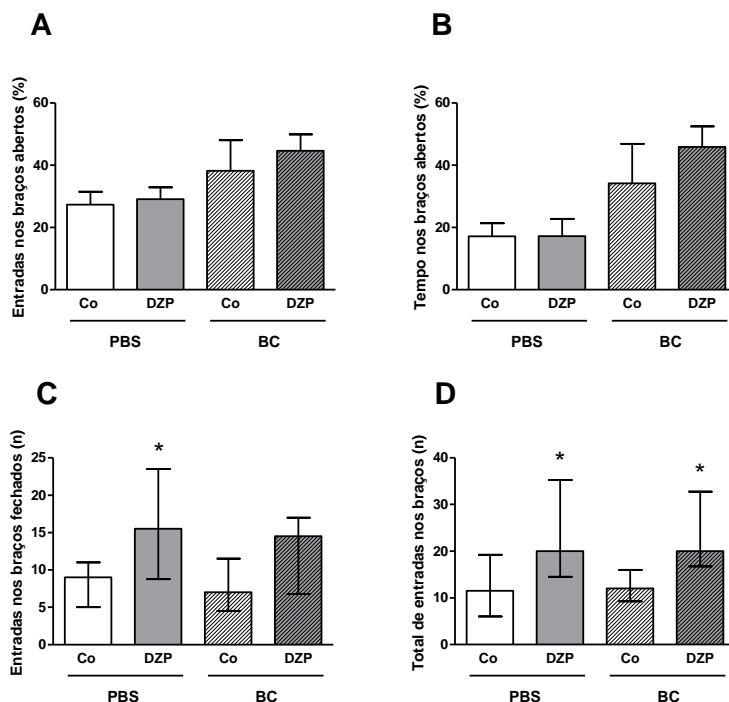
#### 4.5.1.2 Pré-tratamento com o diazepam

Com o intuito de selecionar uma dose de DZP para o teste da interação BC e DZP, foi realizado um experimento piloto com uma curva dose-resposta de diazepam, via i.p., no teste do labirinto em cruz elevado. A primeira dose, abaixo da menor dose com efeito farmacológico do tipo-ansiolítico, foi selecionada para os testes de interação com a BC. A concentração de BC foi selecionada a partir dos resultados obtidos em experimentos comportamentais anteriores e experimentos piloto (ver apêndice D), nos quais se selecionou uma concentração abaixo da menor concentração com efeito farmacológico comportamental.

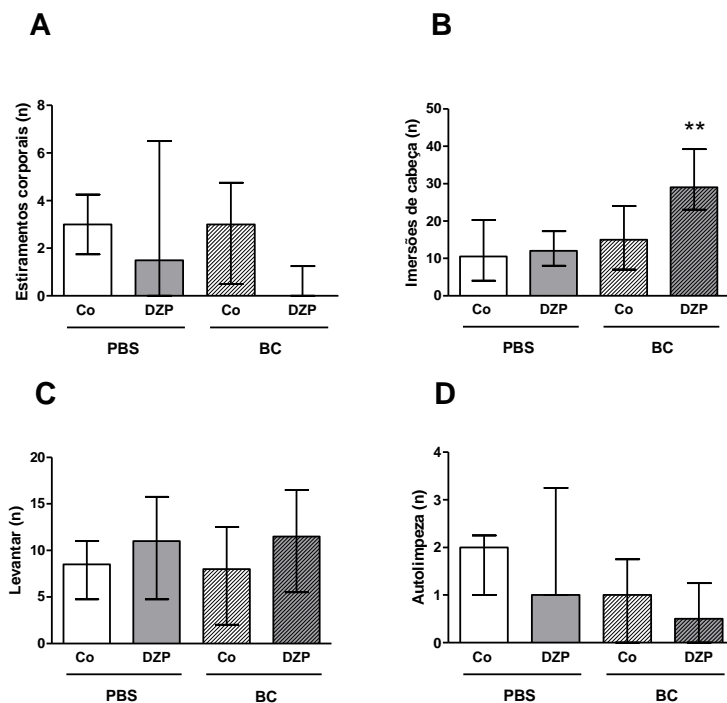
As entradas e tempo em ambos os braços, parâmetros clássicos analisados no LCE, não foram alterados pelo pré-tratamento com DZP, em nenhum dos grupos testados (Figura 14A e 14B), mostrando não haver efeito *per se* nas dose/concentração testadas tanto de DZP (0,025 mg/kg, i.p.), como de BC (0,002 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.). A administração conjunta de DZP e BC também não foi capaz de modificar esses parâmetros, no LCE ( $p>0,05$ ). Com relação às entradas nos braços fechados, houve diferença entre os pré-tratamentos ( $F(1, 34)=12,50$ ,  $p=0,00119$ ) (Figura 14C). O grupo pré-tratado com DZP e tratado com veículo PBS, diferiu estatisticamente do grupo controle (Co) ( $p=0,010$ , Newman-Keuls), com o DZP aumentando o número de entradas nos braços fechados em 100%. Quando a BC foi administrada após o DZP, essa significância deixou de existir e o número de entradas nos BF foi reduzido em 23% comparativamente ao DZP. O número total de entradas nos braços também foi modificado pelo pré-tratamento ( $F(1, 34)=13,12$ ,  $p=0,00094$ ). O DZP aumentou o número total de entradas nos braços em 83%. A BC *per se* não modificou este comportamento, no entanto o pré-tratamento com DZP e o tratamento com BC elevou em 72% o número total de entradas, quando comparado ao grupo tratado somente com BC ( $p=0,022$ ) (Figura 14D).

Relativamente aos parâmetros etológicos, os estiramentos corporais não foram modificados pelos tratamentos *per se* ( $p>0,05$ ) (Figura 15A). As imersões de cabeça diferiram estatisticamente tanto nos pré-tratamentos ( $F(1, 34)=6,02$ ,  $p=0,019$ ), como nos tratamentos ( $F(1, 34)=8,31$ ,  $p=0,0067$ ) (Figura 15B). O grupo pré-tratado com o DZP e tratado com BC aumentou o número de imersões de cabeça em 88% ( $p=0,0034$ ). O comportamento de levantar não foi modificado por esses tratamentos (Figura 15C). Para o comportamento de autolimpeza, houve significância entre o tratamentos ( $F(1, 34)=10,32$ ,  $p=0,0028$ ), no

entanto no teste *post-hoc* não verificamos qualquer diferença estatística ( $p=0,063$ , Newman-Keuls) (Figura 15D).



**Figura 14** - Influência do pré-tratamento com o DZP (diazepam – 0,25 mg/kg, i.p.) nos comportamentos: A) entradas e; B) tempo nos braços abertos; C) entradas nos braços fechados; e D) total de entradas em ambos os braços, em camundongos tratados com a BC (baicaleína – 0,002 pmol/2µl, i.c.v.) e submetidos ao teste do LCE, por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. ou a mediana dos resultados obtidos e intervalo interquartil (Q1-Q3). O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ , quando comparado ao seu respectivo controle; Co x DZP ou Co+PBS x Co+BC; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).



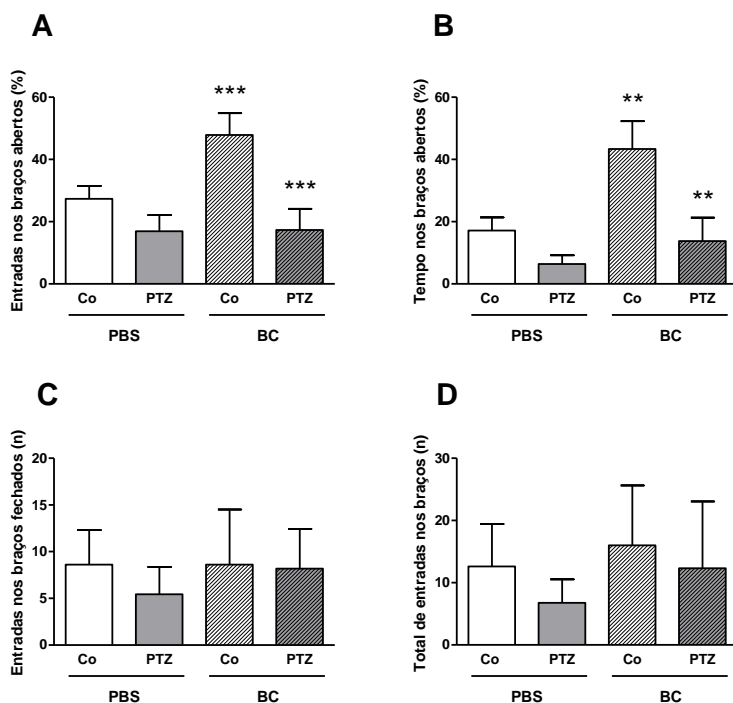
**Figura 15** - Influência do pré-tratamento com o DZP (diazepam – 0,25 mg/kg, i.p.) nos comportamentos: A) estiramientos corporais e; B) imersões de cabeça; C) levantar; e D) autolimpeza, em camundongos tratados com a BC (baicaleína – 0,002 pmol/2 $\mu$ l, i.c.v.) e submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a mediana dos resultados obtidos e intervalo interquartil (Q1-Q3). O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , quando comparado ao seu respectivo controle; Co x DZP ou Co+PBS x Co+BC; na ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).

## 4.5.2 Investigação da atividade GABAérgica não-benzodiazepínica

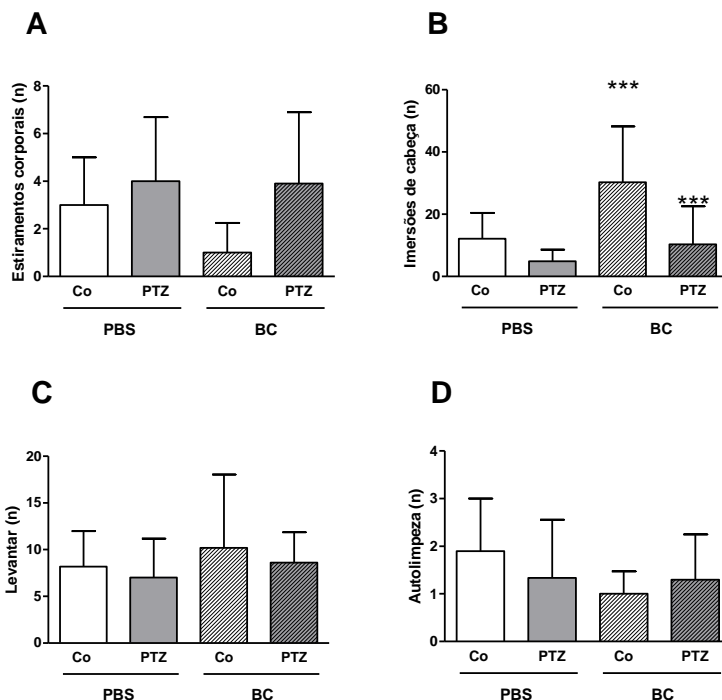
### 4.5.2.1 Pré-tratamento com o pentilenotetrazol

O tratamento com BC aumentou as entradas nos braços abertos em 75% ( $p=0,020$ ) (Figura 16A). O pré-tratamento com PTZ (20 mg/kg, i.p.) reduziu este parâmetro em 63% ( $F(1, 35)= 11,76$ ,  $p=0,0015$ ). Para o tempo despendido nos braços abertos, também foi observado um aumento nesta medida pelo tratamento com a BC, sendo observada uma diferença entre os pré-tratamentos ( $F(1, 35)= 9,52$ ,  $p=0,0039$ ) e tratamentos ( $F(1, 35)= 6,59$ ,  $p=0,014$ ) (Figura 16B). O aumento de 2,5 vezes, promovido pelo tratamento com BC ( $p=0,0077$ ), foi bloqueado pelo pré-tratamento com PTZ ( $p=0,0081$ ), que levou esta medida a níveis próximos do controle. O PTZ não mostrou efeito *per se*. Com relação às entradas nos braços fechados e ao total de entradas, não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) (Figura 16C e 16D).

O comportamento de estiramentos corporais não foi modificado pelo tratamento com a BC ( $p>0,05$ ), embora tenham tido seu número reduzido em 66% (Figura 17A). As imersões de cabeça foram diferentes nos pré-tratamentos ( $F(1, 35)= 12,78$ ,  $p=0,001$ ) e tratamentos ( $F(1, 35)= 9,47$ ,  $p=0,004$ ) (Figura 17B). A BC aumentou as imersões em 145% e o PTZ bloqueou este efeito da BC ( $p=0,002$ ), trazendo o número de imersões ao nível do grupo controle. Os comportamentos de levantar e autolimpeza não foram modificados por nenhum dos tratamentos ( $p>0,05$ ) (Figura 17C e 17D).



**Figura 16** - Influência do pré-tratamento com o PTZ (pentilenotetrazol - 20 mg/kg, i.p.) nos comportamentos: A) entradas e; B) tempo nos braços abertos; C) entradas nos braços fechados; e D) total de entradas em ambos os braços, em camundongos tratados com a BC (baicaleína – 0,2 pmol/2µl, i.c.v.) e submetidos ao teste do LCE, por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ , quando comparado ao seu respectivo controle ;Co x PTZ ou Co+PBS x Co+BC; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).



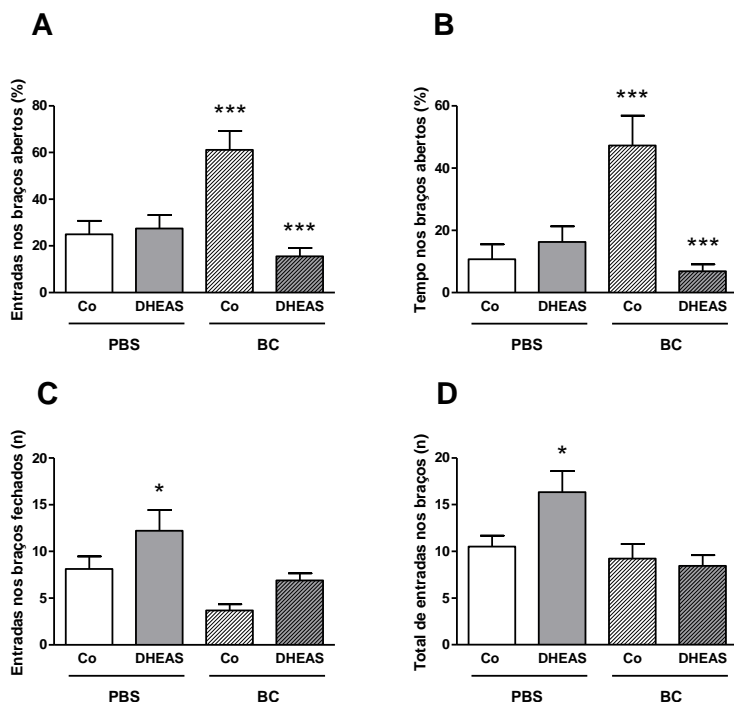
**Figura 17** - Influência do pré-tratamento com PTZ (pentilenotetrazol - 20 mg/kg, i.p.) nos comportamentos: A) estiramentos corporais e; B) imersões de cabeça; C) levantar; e D) autolimpeza, em camundongos tratados com a BC (baicaleína - 0,2 pmol/2μl, i.c.v.) e submetidos ao teste do LCE, por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ , quando comparado ao seu respectivo controle; Co x PTZ ou Co+PBS x Co+BC; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).

#### 4.5.2.2 Pré-tratamento com a dehidroepiandrosterona sulfato de sódio (DHEAS)

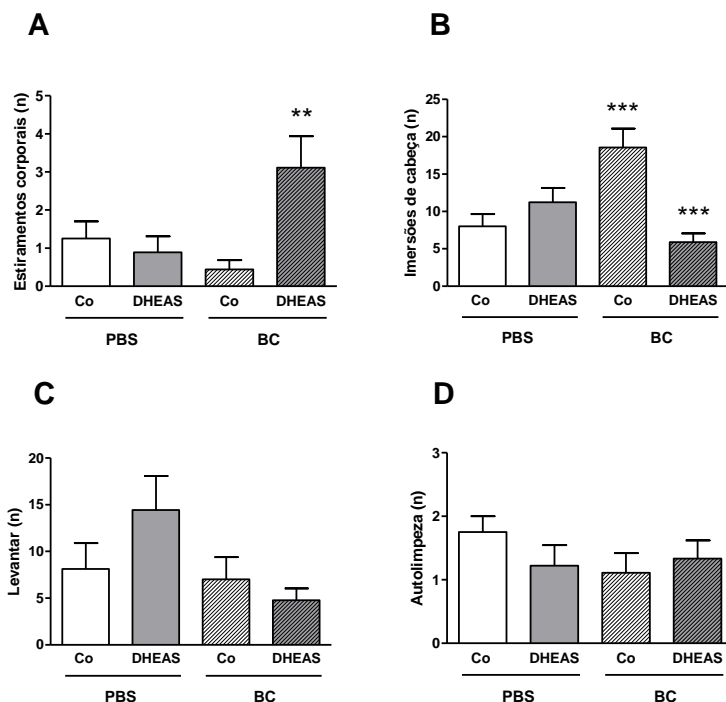
No parâmetro entradas nos braços abertos houve diferença estatística entre pré-tratamentos ( $F(1, 31)=12,66$ ,  $p=0,0012$ ) e entre pré-tratamentos e tratamentos ( $F(1, 31)=15,70$ ,  $p=0,0004$ ). O tratamento com a BC aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos em 2,5 vezes ( $p=0,00067$ ) (Figura 18A). Esse efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com a DHEAS ( $p=0,00020$ ), levando esta medida a níveis abaixo do controle (- 38%). O tempo nos braços abertos também foi modificado pelo tratamento com BC ( $p=0,00065$ ), sendo observada diferença entre pré-tratamentos ( $F(1, 31)=8,10$ ,  $p=0,0077$ ), tratamentos ( $F(1, 31)=4,90$ ,  $p=0,034$ ) e interação entre pré-tratamentos e tratamentos ( $F(1, 31)=14,11$ ,  $p=0,0007$ ). O pré-tratamento com a DHEAS bloqueou o efeito da BC ( $p=0,0004$ ), fazendo o tempo nos braços abertos baixar em quase 7 vezes (Figura 17B). O número de entradas nos braços fechados foi diferente estatisticamente entre pré-tratamentos ( $F(1, 31)=6,81$ ,  $p=0,013$ ) e tratamentos ( $F(1, 31)=12,20$ ,  $p=0,0014$ ). A DHEAS aumentou *per se* o número de entradas nos braços fechados em 50% ( $p=0,047$ ), mas não modificou significativamente o número de EF induzidos pela BC ( $p>0,05$ ) (Figura 17C). O número total de entradas seguiu o mesmo padrão, a DHEAS aumentou *per se* o número total de entradas ( $F(1, 30)=7,87$ ,  $p=0,0086$ ) ( $p=0,017$ ) em 55%, mas não modificou este parâmetros no grupo tratado com BC (Figura 17D).

O número de estiramentos corporais diferiu estatisticamente ( $F(1, 31)=4,63$ ,  $p=0,039$ ) (Figura 19A). O pré-tratamento com a DHEAS ou o tratamento com BC não modificou este parâmetro, mas houve interação entre pré-tratamento e tratamento ( $F(1, 31)=8,00$ ,  $p=0,008$ ). Quando o grupo tratado com BC foi pré-tratado com DHEAS, os estiramentos aumentaram significativamente em 8 vezes ( $p=0,0071$ ). Foi também observada uma diferença significativa entre os pré-tratamentos ( $F(1, 31)=6,08$ ,  $p=0,019$ ) e uma interação entre pré-tratamento e tratamento ( $F(1, 31)=17,23$ ,  $p=0,00023$ ) no parâmetro imersões de cabeça (Figura 19B). A BC aumentou o número de imersões de cabeça ( $p=0,0014$ ) em 131% e este efeito foi antagonizado pelo tratamento com a DHEAS ( $p=0,00044$ ), fazendo esse valores baixarem aos níveis controle. Os comportamentos de levantar e autolimpeza não foram modificados por nenhum dos tratamentos ( $p>0,05$ ) (Figura 19C e 19D).





**Figura 18** - Influência do pré-tratamento com a DHEAS (dehidroepiandrosterona sulfatode sódio – 1 mg/kg, i.p.) nos comportamentos: A) entradas; B) tempo nos braços abertos; C) entradas nos braços fechados; e D) total de entradas em ambos os braços, em camundongos tratados com a BC (baicaleína – 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) e submetidos ao teste do LCE, por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ , quando comparado ao seu respectivo controle; Co x DHEAS ou Co+PBS x Co+BC; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).

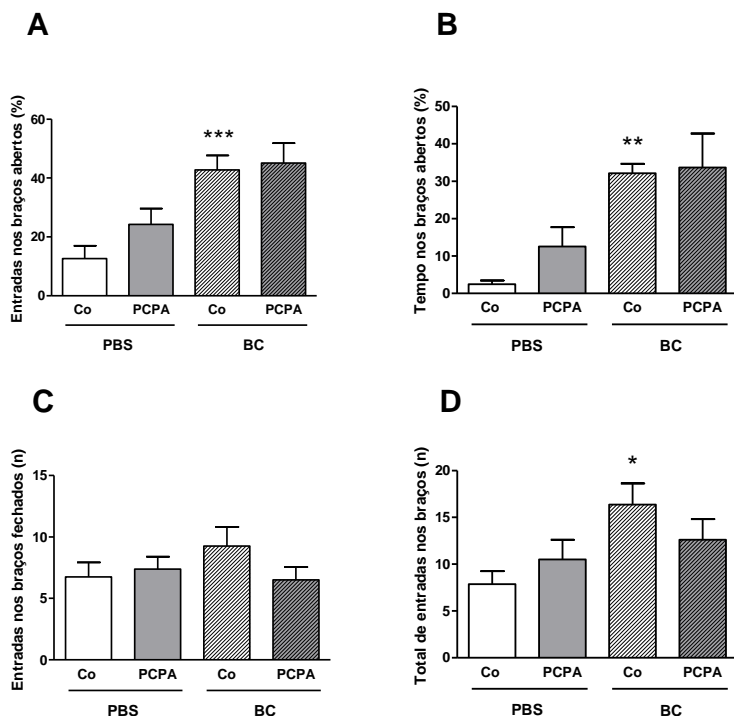


**Figura 19** - Influência do pré-tratamento com DHEAS (dehidroepiandrosterona sulfato de sódio – 1 mg/kg, i.p.) nos comportamentos: A) estiramentos corporais e; B) imersões de cabeça; C) levantar; e D) autolimpeza, em camundongos tratados com a BC (baicaleína – 0,2 pmol/2µl, i.c.v.) e submetidos ao teste do LCE, por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ , quando comparado ao seu respectivo controle; Co x DHEAS ou Co+PBS x Co+BC; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls.

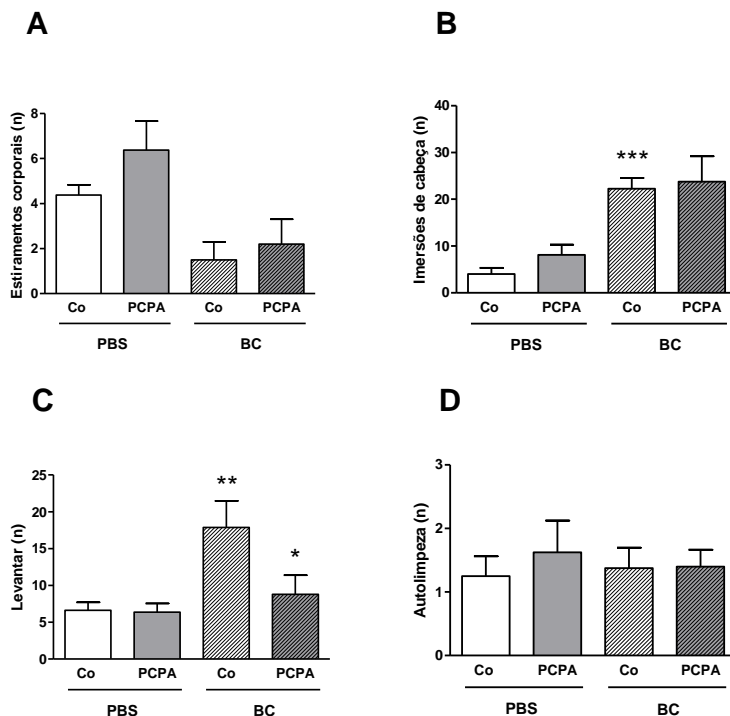
### 4.5.3 Investigação da atividade serotoninérgica

No parâmetro entradas nos braços abertos houve diferença estatística entre tratamentos ( $F(1, 30)=20,25$ ,  $p=0,00009$ ) (Figura 20A). O tratamento com a BC aumentou em 3 vezes as entradas nos braços abertos ( $p=0,0021$ ), efeito esse não modificado pelo PCPA. O tempo nos braços abertos também foi modificado pelo tratamento com BC ( $p=0,0046$ ), que o elevou em 13 vezes, sendo observada uma diferença entre tratamentos ( $F(1, 30)=17,56$ ,  $p=0,00022$ ), sem modificação pelo pré-tratamento com o PCPA (Figura 20B). O número de entradas nos braços fechados não foi modificado por nenhum dos tratamentos (Figura 20C). Entretanto o número total de entradas foi diferente entre os tratamentos ( $F(1, 30)=6,56$ ,  $p=0,015$ ) e a BC dobrou o número total de entradas nos braços do LCE ( $p=0,032$ ), mas esse efeito não foi modificado pelo PCPA ( $p>0,05$ ) (Figura 20D).

O número de estiramentos corporais diferiu estatisticamente entre os tratamentos ( $F(1, 30)=12,48$ ,  $p=0,0013$ ), no entanto, as comparações relevantes não foram significantes ( $p>0,05$ ) (Figura 21A). Foi observada uma diferença entre tratamentos ( $F(1, 30)=21,96$ ,  $p=0,00005$ ) no parâmetro imersões de cabeça (Figura 21B). A BC aumentou em 5 vezes o número de imersões de cabeça ( $p=0,0035$ ), e este aumento não foi modificado pelo pré-tratamento com o PCPA ( $p>0,05$ ). Para o comportamento de levantar foi observada uma diferença entre os tratamentos ( $F(1, 30)= 8,00$ ;  $p=0,008$ ) (Figura 21C). A BC elevou os comportamentos de levantar em 3 vezes ( $p=0,0071$ ). O pré-tratamento com o PCPA impediu esse efeito ( $p=0,012$ ). O comportamento de autolimpeza não foi modificado por nenhum dos tratamentos ( $p>0,05$ ) (Figura 21D).



**Figura 20** - Influência do pré-tratamento com o PCPA (dl-p-clorofenilalanina etil ester – 100 mg/kg, i.p., 4 dias) nos comportamentos: A) entradas e; B) tempo nos braços abertos; C) entradas nos braços fechados; e D) total de entradas em ambos os braços, em camundongos tratados com a BC (baicaleína – 0,2 pmol/2 µl, i.c.v.) e submetidos ao teste do LCE, por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ , quando comparado ao seu respectivo controle; Co x PCPA ou Co+PBS x Co+BC; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).



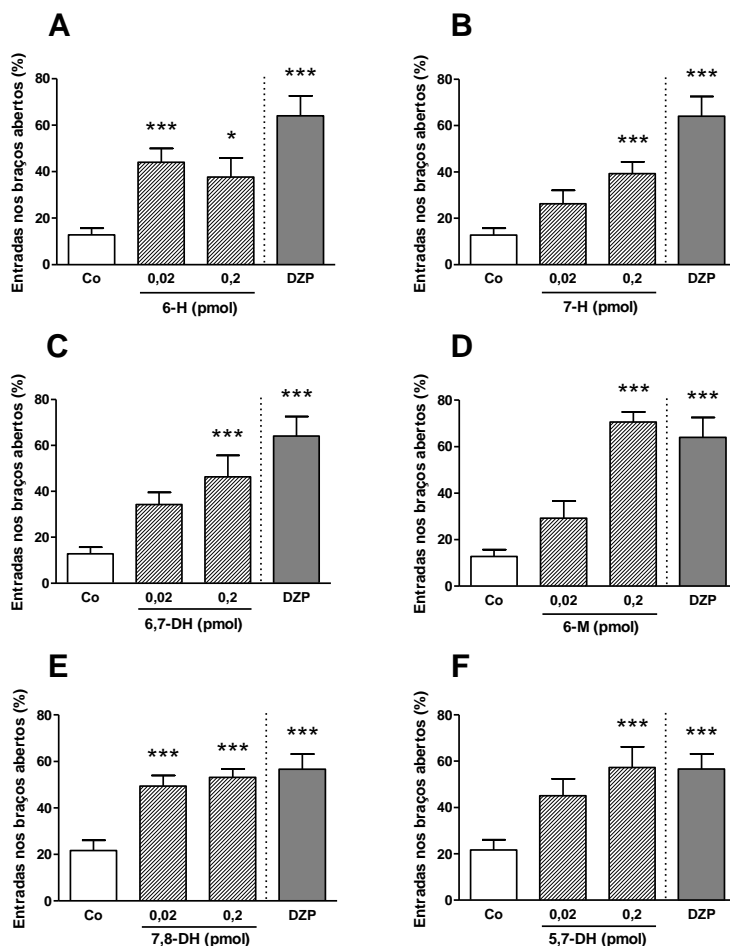
**Figura 21** - Influência do pré-tratamento com o PCPA (dl-p-clorofenilalanina etil ester – 100 mg/kg, i.p., 4 dias) nos comportamentos: A) estiramientos corporais e; B) imersões de cabeça; C) levantar; e D) autolimpeza, em camundongos tratados com a BC (baicaleína – 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) e submetidos ao teste do LCE, por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ , quando comparado ao seu respectivo controle; Co x PCPA ou Co+PBS x Co+BC; ANOVA de duas vias seguida pelo teste Newman-Keuls).

#### 4.6 ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

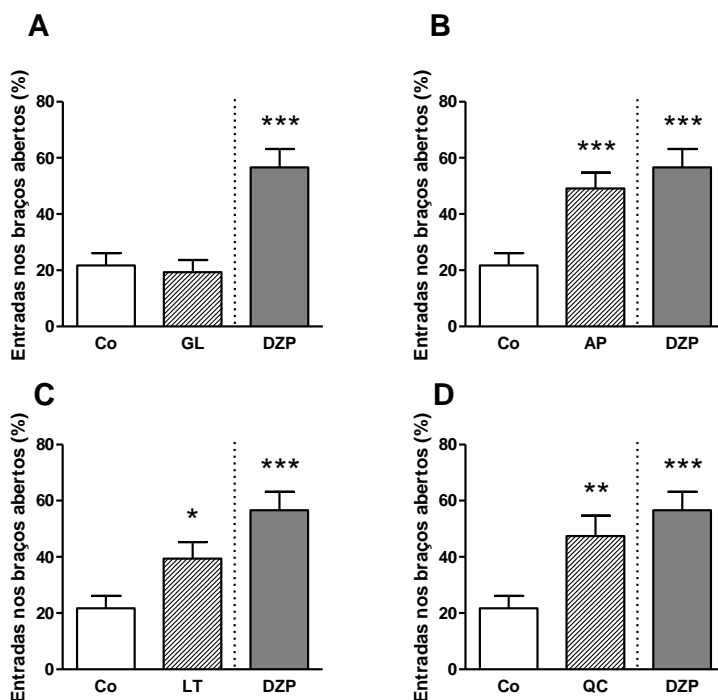
Pelo menos em uma das concentrações testadas, 9 dos 10 flavonoides mostraram atividade do tipo ansiolítica quando administrados pela via i.c.v. Apenas a galangina não modificou nenhum dos parâmetros registrados no LCE, não demonstrando, portanto, nenhuma atividade do tipo-ansiolítica, na concentração testada.

Embora a atividade do tipo ansiolítica tenha sido observada em quase todos flavonoides, em uma mesma concentração o grau de significância foi variado. Com relação às entradas nos braços abertos, a 6-metoxiflavona (6-M) aumentou este parâmetro na concentração de 0,2 pmol ( $F(2, 24) = 27,17$ ,  $p=0,00000$ ;  $p=0,00000$ ), de forma similar à observada no controle positivo DZP ( $p=0,00003$ ) (Figura 22D). A 7,8-dihydroxiflavona (7,8-DH) mostrou efeito semelhante ao da 6-hidroxi-flavona (6-H), sendo os efeitos observados nas duas concentrações testadas para os dois flavonoides ( $F(2, 25) = 16,89$ ,  $p=0,00002$ ;  $p=0,00019$  e  $p=0,00003$ ) ( $F(2, 25) = 7,35$ ,  $p=0,003$ ;  $p=0,0022$  e  $p=0,016$ ) (Figura 22E e 22A). A 5,7-DH promoveu efeito do tipo ansiolítico apenas na concentração mais alta, de 0,2 pmol ( $F(2, 24) = 6,43$ ,  $p=0,0057$ ;  $p=0,0032$ ). A flavona 6,7-hidroxi-flavona e a 7-hidroxi-flavona apresentaram efeito semelhante e apenas na concentração mais alta ( $F(2, 25) = 6,5$ ,  $p=0,0053$ ;  $p=0,0028$ ) ( $F(2, 25) = 7,78$ ,  $p=0,0023$ ;  $p=0,0011$ ). A luteolina, quercetina e apigenina também apresentaram atividade do tipo-ansiolítica na concentração testada de 0,2 pmol ( $p=0,032$ ;  $p=0,0078$  e  $p=0,0015$ ) (Figura 23C, 23D e 23B).

Com relação ao tempo nos braços abertos, a 7-H não foi capaz de modificar esse parâmetro nas concentrações testadas ( $p>0,05$ ) (Figura 24B). A 6-M, na concentração de 0,2 pmol, aumentou o tempo nos braços abertos da mesma forma que o fez para o parâmetro de entradas nestes braços ( $F(2, 24) = 17,88$ ,  $p=0,00002$ ;  $p=0,00000$ ). A 5,7-DH e a 7,8-DH obtiveram efeitos semelhantes aos da 6-M, com ambas concentrações testadas aumentando o tempo nos braços abertos ( $F(2, 24) = 8,0$ ,  $p=0,0021$ ;  $p=0,023$  e  $p=0,0012$ ) ( $F(2, 25) = 12,17$ ,  $p=0,0002$ ;  $p=0,00047$  e  $p=0,00045$ ) (Figura 24F e 24E). A 6-hidroxi-flavona teve efeito apenas na concentração mais baixa ( $F(2, 25) = 3,56$ ,  $p=0,043$ ;  $p=0,024$ ) (Figura 24A), enquanto a 6,7-DH teve efeito semelhante, mas na concentração mais alta ( $F(2, 25) = 4,84$ ,  $p=0,0167$ ;  $p=0,0098$ ) (Figura 24C). A luteolina, quercetina e apigenina também aumentaram o tempo nos braços abertos, de forma semelhante ( $p=0,022$ ;  $p=0,044$  e  $p=0,014$ ) (Figura 25C, 25D e 25B).

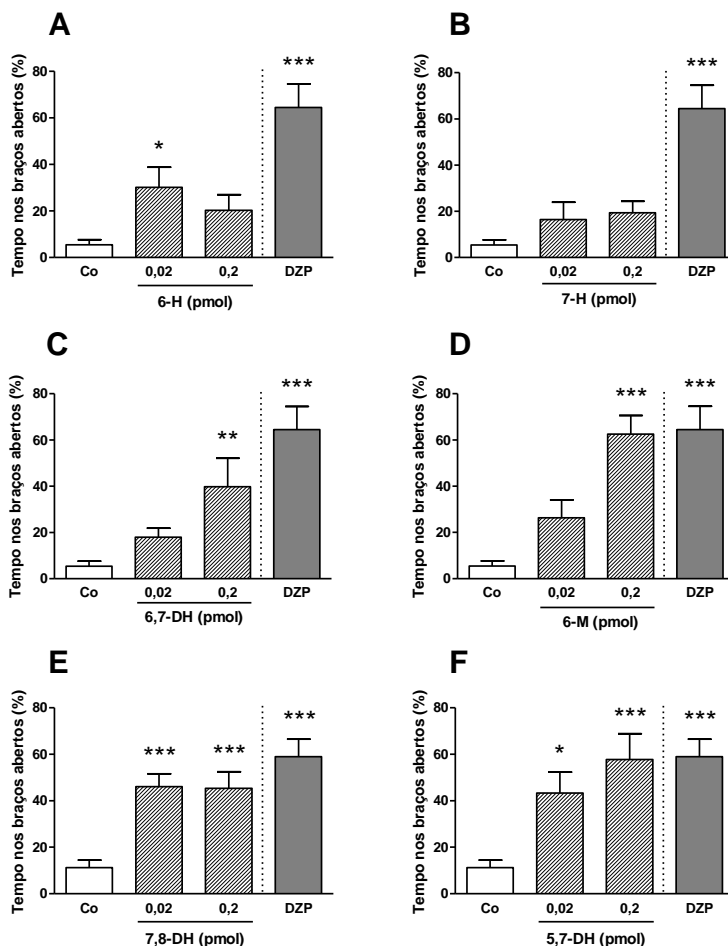


**Figura 22** - Efeito do tratamento de camundongos com: A) 6-hidroxiavona, B) 7-hidroxiavona, C) 6,7-dihidroxiavona, D) 6-metoxiavona, E) 7,8-dihidroxiavona ou F) 5,7-dihidroxiavona (0,02 ou 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.), nas entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado durante 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005 quando comparado ao grupo controle – Co; ANOVA de uma via seguida pelo teste Dunnett. Para o controle positivo diazepam – DZP – na concentração de 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v., foi utilizado o teste t).

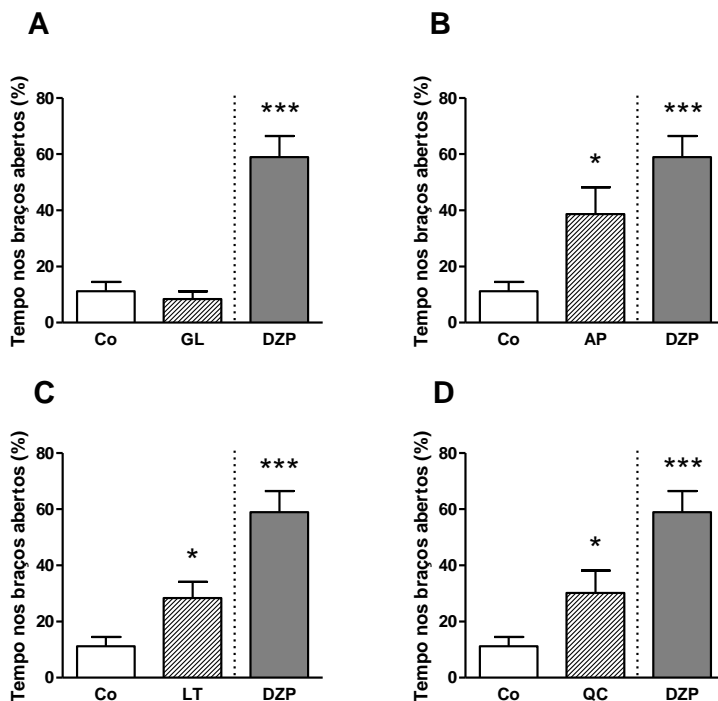


**Figura 23** - Efeito do tratamento de camundongos com: A) galangina, B) apigenina, C) luteolina, D) quercetina, na concentração de 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v., nas entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado durante 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  quando comparado ao grupo controle – Co; ANOVA de uma via seguida pelo teste Dunnett. Para o controle positivo diazepam – DZP – na concentração de 7 nmol/2  $\mu$ l/i.c.v., foi utilizado o teste t).





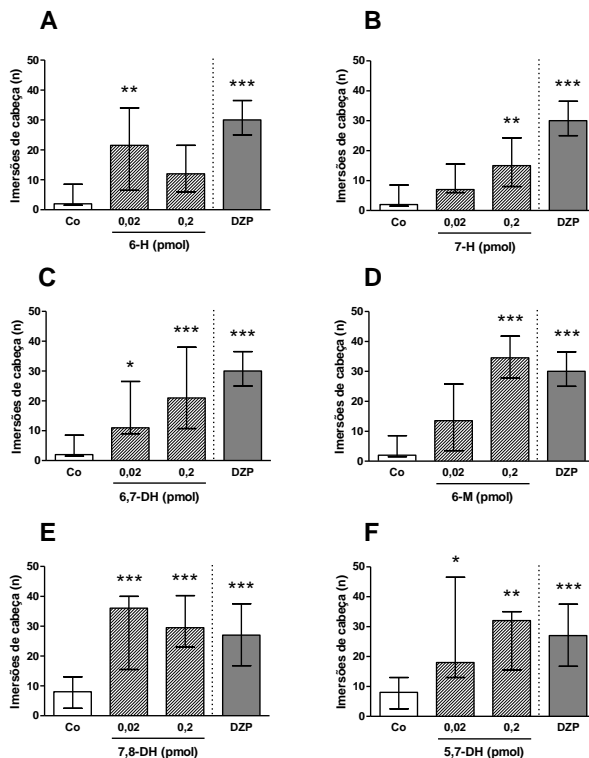
**Figura 24** - Efeito do tratamento de camundongos com: A) 6-hidroxiavona, B) 7-hidroxiavona, C) 6,7-dihidroxiavona, D) 6-metoxiavona, E) 7,8-dihidroxiavona ou F) 5,7-dihidroxiavona (0,02 ou 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.), no tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado durante 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005 quando comparado ao grupo controle – Co; ANOVA de uma via seguida pelo teste Dunnett. Para o controle positivo diazepam – DZP – na concentração de 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v., foi utilizado o teste t).



**Figura 25** - Efeito do tratamento de camundongos com: A) galangina, B) apigenina, C) luteolina, D) quercetina, na concentração de 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v., no tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado durante 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005 quando comparado ao grupo controle – Co, pelo teste t. O diazepam – DZP – na concentração de 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v., foi utilizado como controle positivo.

Com relação ao número de imersões de cabeça, a 6-M se destacou na concentração de 0,2 pmol, aumentando o número de imersões em 15 vezes ( $H(2, N=27)=13,17, p=0,0014; p=0,00089$ ) (Figura 26D). A 7,8-DH promoveu efeito semelhante, com as duas concentrações testadas aumentaram o número de comportamentos ( $p=0,0029$  e  $p=0,001$ ) (Figura 26E). A 6,7-DH também elevou o número de imersões em 5 e 10 vezes, respectivamente ( $p=0,048$  e  $p=0,0016$ ) (Figura 26C). A 5,7-DH aumentou as imersões de cabeça em 2 e 4

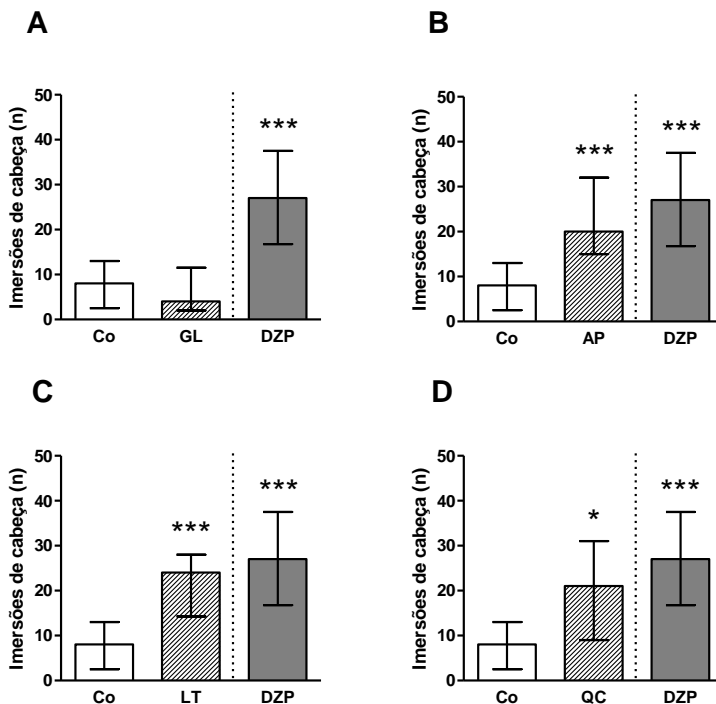
vezes, respectivamente ( $H(2, N=27)=11,39, p=0,0034; p=0,022$  e  $p=0,0054$ ) (Figura 26F). A 6-H aumentou o número de imersões, na concentração mais baixa, em 10 vezes ( $H(2, N=28)=10,17, p=0,0062; p=0,007$ ) (Figura 26A). A 7-H produziu efeito apenas na concentração mais alta, aumento as imersões de cabeça em 7,5 vezes ( $H(2, N=28)=8,96, p=0,01; p=0,0099$ ) (Figura 26B).



**Figura 26** - Efeito do tratamento de camundongos com: A) 6-hidroxiavona, B) 7-hidroxiavona, C) 6,7-dihidroxiavona, D) 6-metoxiavona, E) 7,8-dihidroxiavona, F) 5,7-dihidroxiavona (0,02 ou 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v.) no número de imersões de cabeça, observados no teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min. Cada coluna representa a mediana dos resultados obtidos e o intervalo interquartil (Q1-Q3). O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,005$  quando comparado ao grupo controle – Co; Kruskal-Wallis seguido do teste das Comparações

múltiplas. Para o controle positivo diazepam – DZP 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v. – foi utilizado o teste U de Mann-Whitney).

Os flavonoides QC, AP e LT, também aumentaram o número de imersões de cabeça, na concentração testada, em cerca de 2,5-3 vezes ( $p=0,027$ ;  $p=0,0026$  e  $p=0,0037$ ) (Figura 27D, 27B e 27C).



**Figura 27** - Efeito do tratamento de camundongos com: A) galangina, B) apigenina, C) luteolina, D) quercetina, na concentração de 0,2 pmol/2  $\mu$ l, i.c.v., no número de imersões de cabeça, observados no teste do labirinto em cruz elevado, durante 5 min. Cada coluna apresenta a mediana dos resultados obtidos e o intervalo interquartil (Q1-Q3). O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  quando comparado ao grupo controle – Co, teste U de Mann-Whitney. O diazepam – DZP 7 nmol/2  $\mu$ l, i.c.v. – foi utilizado como controle positivo).

Nenhum dos flavonoides testados modificou, de forma significativa, o número de entradas nos braços fechados ou o número

total de entradas no LCE, mostrando serem desprovidos de efeito sedativo *per se* ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

No tocante aos estiramentos corporais, apenas a 6-M promoveu redução deste comportamento, quando comparada ao grupo controle ( $H(2, N=27)=16,92$ ,  $p=0,0002$ ) ( $p=0,018$  e  $p=0,0010$ ) (Tabela 3). Resultado semelhante foi também observado para o DZP ( $p=0,0036$ ). Para o segundo grupo de flavonoides testados, nenhuma diferença foi observada, mesmo para o grupo DZP, em virtude do reduzido número de estiramentos também observados no grupo controle.

Para os comportamentos de levantar, tanto a 6-H nas duas concentrações testadas, como a concentração mais baixa da 6,7-DH, promoveram aumento significativo do comportamento ( $H(2, N=28)=10$ ,  $p=0,0067$ ;  $p=0,016$  e  $p=0,021$ , respectivamente para 0,02 e 0,2 pmol da 6-H) ( $H(2, N=28)=8,10$ ,  $p=0,017$ ;  $p=0,014$  para a 6,7-DH) (Tabela 3). Nenhuma diferença significativa foi observada para os demais flavonoides testados ou mesmo para os grupos controle DZP, uma vez que o parâmetro é um indicativo de atividade exploratória vertical ( $p > 0,05$ ).

Os comportamentos de autolimpeza também não foram modificados nem pelo tratamento com o DZP, nem com os flavonoides em estudo nas concentrações testadas.

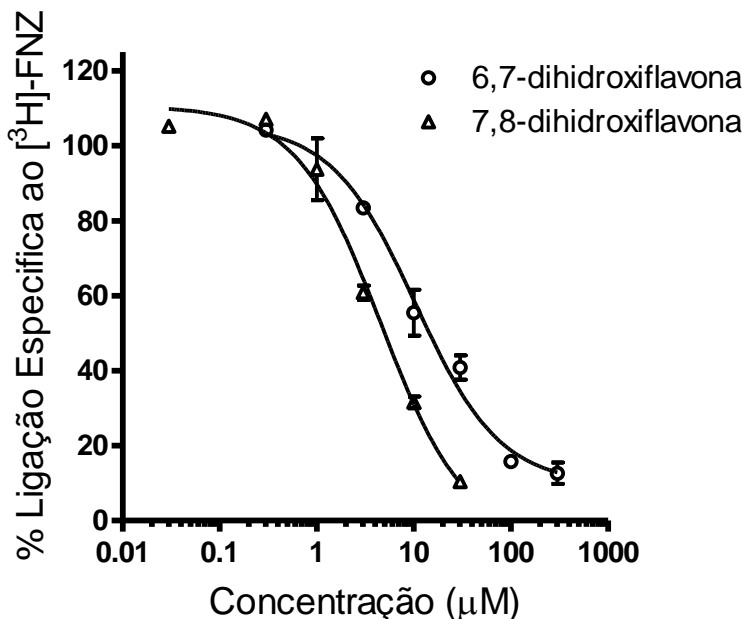
**Tabela 3** – Efeito do tratamento i.c.v. com flavonoides estruturalmente relacionados à BC (baicaleína) no número de entradas nos braços fechados, total de entradas nos braços, número de estiramentos corporais, comportamentos de levantar e autolimpeza, no LCE (labirinto em cruz elevado).

Tratamento (#)	Dose (pmol)	Entradas nos braços fechados (n)	Total de entradas (n)	Estiramentos corporais (n)	Levantar (n)	Auto-limpeza (n)
PBS	<sup>a</sup>	7 (6-9)	7 (7-10)	5 (1-8)	4 (2-7)	1 (1-1)
DZP	<sup>b</sup>	5 (3-12)	14 (6-20)	0 (0-0)***	6 (3-11)	1 (1-1)
6-H	0,02	7 (5-9)	15 (8-18)	0,5 (0-1)	10 (7-3)*	1 (1-2)
	0,2	8 (4-9)	11 (9-16)	0 (0-2)	9 (8-14)*	2 (1-2)
7-H	0,02	7 (5-11)	8 (6-14)	4 (1-5)	10 (7-11)	1 (1-2)
	0,2	6,5 (4-10)	12 (7-18)	1 (1-2)	9 (4-14)	2 (1-3)
6,7-DH	0,02	7 (5-9)	13 (7-16)	2 (1-3)	17 (7-18)*	1 (1-1)
	0,2	6 (2-8)	10,5 (8-14)	1,5 (0-3)	7,5 (6-10)	1 (1-2)
6-M	0,02	11,5 (6-16)	18,5 (6-25)	0 (0-2)*	14 (4-20)	0,5 (0-3)
	0,2	4 (2,5-8,5)	19 (13-22,5)	0 (0-0)***	5 (4-10,5)	2 (0,5-2,5)
PBS	<sup>c</sup>	8 (7-9)	10 (9-12)	0 (0-1)	6 (3-16)	1 (1-2)
DZP	<sup>d</sup>	9,5 (5-12)	19 (14-25)*	0 (0-0)	10 (3-21)	1 (0-1)
7,8-DH	0,02	10 (6-11)	18 (12-20)	0 (0-1)	7 (4-12)	1 (1-1)
	0,2	7 (6-9)	17 (12-21)	0 (0-0)	9,5 (7-12)	2 (1-2)
5,7-DH	0,02	6 (3-8)	9 (8-16)	0 (0-1)	7 (3-13)	1 (0-2)
	0,2	6 (2-11)	15 (10-22)	0 (0-0)	17 (4-20)	1 (0-1)
GL	0,2	8 (6-11)	8 (7-16)	0 (0-0)	8 (5-12)	1 (1-1)
AP	0,2	6 (6-7)	11 (10-13)	0 (0-1)	10 (5-11)	2 (1-3)
LT	0,2	6 (6-10)	10,5 (9-18)	0 (0-1)	10 (6-15)	1,5 (1-2)
QC	0,2	7 (4-9)	15 (8-9)	1 (0-1)	9 (7-10)	1 (0-2)

<sup>#</sup>Tratamentos: 6-hidroxiflavona (6-H), 7-hidroxiflavona (7-H), 6,7-dihidroxiflavona (6,7-DH), 6-metoxiflavona (6-M), 7,8-dihidroxiflavona (7,8-DH), 5,7-dihidroxiflavona (5,7-DH), galangina (GL), apigenina (AP), luteolina (LT) e quercetina (QC) (2 µl, i.c.v.). <sup>a,c</sup> PBS (veículo DMSO 1% em PBS - 2µl, i.c.v.) foi usado como solução controle. <sup>b,d</sup> DZP (diazepam – 7 nmol/2 µl, i.c.v.) foi usado como controle positivo e comparado com o grupo controle pelo teste U de Mann-Whitney. Os resultados estão expressos como mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3) de 8-10 animais. (\*p<0,05; \*\*p< 0,01; \*\*\*p< 0,005 quando comparado ao grupo controle; Kruskal-Wallis seguido do teste das comparações múltiplas, ou teste U de Mann-Whitney nos tratamentos com apenas uma concentração).

#### 4.6.1 Ensaios bioquímicos de *binding*

Os flavonoides 7,8-DH, 6,7-DH e GL, foram testados nos ensaios de *binding* até a concentração de 300  $\mu\text{M}$  e, a porcentagem de inibição do *binding* do  $[^3\text{H}]$ -FNZ nos receptores BDZ, foi de 100%, 90% e 40%, respectivamente. Os ensaios mostraram ainda uma alta afinidade da 6,7-DH e 7,8-DH ao sítio BDZ. O  $\text{CI}_{50}$  de 6,7-DH, foi de aproximadamente 15  $\mu\text{M}$ , e para 7,8-DH foi de 5  $\mu\text{M}$ , conforme expresso nas curvas de *binding* abaixo (Figura 28), com um  $K_i \pm \text{E.P.M.}$  de  $11,7 \pm 1,8 \mu\text{M}$  e  $4,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ), respectivamente. A GL não inibiu o *binding* de  $[^3\text{H}]$ -FNZ ao sítio BDZ. O diazepam foi utilizado como controle positivo com um  $K_i = 0,0070 \pm 0,0005 \mu\text{M}$  ( $n= 5$ ), como já descrito (MARDER; PALADINI, 2002).



**Figura 28** – Curvas de competição da 6,7-dihidroxiavona (6,7-DH) e 7,8-dihidroxiavona (7,8-DH) com  $[^3\text{H}]$ -FNZ ( $^3\text{H}$ -flunitrazepam) nos ensaios de *binding* ao sítio benzodiazepínico em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de rato. Os dados mostrados representam a média  $\pm$  E.P.M. de valores provenientes de experimentos realizados em duplicata e replicado três vezes.

## 5 DISCUSSÃO

Muito do que sabemos sobre neurociência é resultado direto do estudo de produtos naturais psicoativos. Esse tipo de investigação oferece uma abordagem para identificar novos agentes que tratem distúrbios do comportamento, como a ansiedade, a esquizofrenia e a depressão, além de novas ferramentas químicas para melhor compreender e elucidar seus mecanismos biológicos (PRISINZANO, 2009).

Nesse contexto, atualmente são conhecidos alguns efeitos de flavonoides, principalmente quando analisados em testes experimentais *in vitro*, mas ainda restam muitas dúvidas a respeito de seus reais benefícios *in vivo* para a saúde. No que diz respeito aos efeitos no SNC, segundo Harborne e Williams (2000), os flavonoides podem constituir uma “promessa” como agentes terapêuticos. No entanto, o conhecimento acerca do mecanismo de ação de flavonoides ainda é obscuro e merece ser ampliado, pois estas substâncias têm potencial para fornecer novas ferramentas farmacológicas para o tratamento de distúrbios como a insônia, a ansiedade e a depressão. Estudos tentando estabelecer uma correlação estrutura-atividade têm sido realizados *in vitro* (MARDER et al., 2001; ZHU et al., 2007), permitindo sugerir uma possível correlação estrutural com a atividade farmacológica. No entanto, esses estudos não descartam a necessidade de se realizar ensaios comportamentais, uma vez que os ensaios *in vitro* apenas sugerem, mas não determinam, uma atividade *in vivo*, como já demonstrado pela literatura (AVALLONE et al., 2000).

Nesse intuito, foi realizado no presente estudo uma investigação dos efeitos comportamentais do flavonoide baicaleína (BC), flavona promissora como ferramenta terapêutica para patologias do SNC que envolvem o estresse oxidativo (MU et al., 2009; TARRAGÓ et al., 2008), e originalmente obtida a partir das raízes da *Scutellaria baicalensis*, planta medicinal chinesa conhecida por suas propriedades protetoras contra patologias que acometem o SNC. Adicionalmente realizamos um estudo de estrutura-atividade com flavonas e flavonóis relacionados à BC.

Os ensaios foram desenvolvidos com fêmeas, que embora sub-representadas nos estudos em geral, são importantes, uma vez que as fêmeas demonstram respostas de comportamento emocional diferente dos machos, especialmente no que diz respeito à prevalência de ansiedade em seres humanos, onde apresenta maior incidência em



mulheres que em homens (PALANZA, 2001). Assim, foi necessário determinar a fase do ciclo estral em que se encontravam os animais, já que os hormônios ovarianos modificam as respostas das fêmeas ao estresse (BITRAN; DOWD, 1996). A alopregnanolona, um metabólito da progesterona, é um neuroesteroide que sabidamente exibe ações hipnótica, ansiolítica e anticonvulsivante (BITRAN; DOWD, 1996; BROTH et al., 1997; PESCE et al., 2000). Desta forma, animais em fase de estro do ciclo poderiam gerar resultados falso positivos/negativos, além de variações nos resultados experimentais. O ciclo foi determinado segundo Hoar e Hickman (1975). As fêmeas foram usadas nos testes comportamentais mediante padronização prévia e com a verificação da ausência de diferenças entre os dados obtidos com as mesmas e dados anteriormente obtidos com o uso de machos em nosso laboratório (dados não publicados), já que testes experimentais apontam as fêmeas de algumas linhagens de camundongos, como a BALB/c e C57BL, como apresentando respostas emocionais mais pronunciadas em testes comportamentais (ARCHER, 1977).

Para investigar o possível efeito hipnosedativo da BC, procedeu-se a construção de uma curva concentração-resposta no teste da hipnose induzida por éter etílico (VIEIRA, 2001). Este teste segue, em linhas gerais, os mesmos princípios do sono barbitúrico (CARLINI; BURGOS, 1979; CARLINI et al., 1986; CHWEH et al., 1987), porém o agente indutor difere (LAPA et al., 2003). Os mecanismos farmacodinâmicos do sono induzido por agente inalatório são semelhantes, sendo mediados pela atividade depressora dos compostos no SNC. Esse método apresenta vantagens práticas sobre o método tradicional de sono induzido por barbitúricos na promoção da hipnose, (CHAMBERS et al., 1978) uma vez que o éter etílico, um anestésico inalatório de rápida indução e de rápida recuperação, é eliminado pela via pulmonar, mais rapidamente, e assim o organismo sofre menos efeitos da exposição ao anestésico (TREVOR; MILLER, 1998). O método é simples, confiável e permite descartar possíveis interferências farmacocinéticas de compostos com o indutor de hipnose, evitando resultados falso-positivos decorrentes de interação farmacocinética, como descrito para os barbitúricos (VIEIRA, 2001; DUARTE, 2007).

Observou-se com os nossos resultados que a BC promoveu aumento do tempo de sono em concentrações mais baixas, potencializando o sono induzido por éter etílico, o que sugere um efeito sedativo para este composto. Embora Tarragó e colaboradores (2008) tenham recentemente relatado que a BC é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, o uso da administração central nos testes seguintes e

no teste do sono etéreo, utilizados no presente trabalho, permitiu a observação direta do efeito da BC, sem interferência com as vias metabólicas, o que pode ser importante do ponto de vista clínico, uma vez que a baicaleína interage com algumas enzimas do citocromo P-450 (CYP) e CYP1A2, presente nos microsossomos hepáticos (KIM et al., 2002).

Com relação à ansiedade, muito do conhecimento existente sobre a ansiedade humana foi obtido pela experimentação animal. Até a década de 70, os modelos experimentais mais empregados envolviam situações em que era necessário o condicionamento dos animais, empregando-se estímulos aversivos (RODGERS et al., 1997). A partir da década de 80, passou a ser dada uma maior atenção aos modelos animais de ansiedade etologicamente fundamentados como o labirinto em cruz elevado (LCE). O teste do labirinto em cruz elevado deriva de um trabalho de Montgomery (1955), que relacionou medo e atividade exploratória. Handley e Mitani (1984) então desenvolveram um labirinto elevado em X no qual a intensidade do medo natural induzido, poderia ser medida pela variação da proporção de exploração (comportamento exploratório) entre os braços abertos e fechados do equipamento. Como consequência, os roedores tendem a evitar os braços abertos e permanecem por mais tempo nos braços fechados do LCE. De uma forma geral, fármacos ansiolíticos aumentam, enquanto agentes ansiogênicos diminuem as entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE. O teste foi, posteriormente, aperfeiçoado por Pellow e colaboradores (1985) e, por fim, adaptado para camundongos por Lister (1987).

No teste do LCE a atividade locomotora é avaliada pelo número total de entradas ou pelo número de entradas nos braços fechados (LISTER, 1987), sendo a primeira também associada a um comportamento do tipo ansioso, uma vez que animais com perfil mais “ansioso” apresentam um nível reduzido de atividade geral (RODGERS; COLE, 1994). Trabalhos usando análise fatorial mostraram haver uma correlação positiva entre número de entradas nos braços fechados e a atividade motora (RODGERS; DALVI, 1997). Os resultados neste teste, portanto, mostram que nas menores concentrações de BC houve efeito do tipo ansiolítico, sem efeito sedativo, já que não houve alteração no número total de entradas nos braços do labirinto, mas somente nas entradas nos braços fechados, porém de modo não significativo, mostrando, portanto, que a BC apresenta uma tendência para um efeito sedativo no teste do LCE, efetivamente mostrado no teste do sono etéreo. Esse resultado pode ser indicativo de um efeito agonista parcial

benzodiazepínico, capaz de potencializar um efeito sedativo, mas não de promovê-lo *per se*, como o efeito agonista parcial benzodiazepínico descrito para a baicalina, a forma glicosilada da baicaleína, no teste de *rota-rod* (WANG et al., 2008).

Este trabalho é o primeiro a relatar o efeito sedativo para a baicaleína, no teste do SE, em concentrações na faixa de pmol e pela via central (i.c.v.), uma vez que não foram encontrados relatos deste efeito até o momento nem para a baicaleína nem para seu glicosídeo. A este respeito, existem flavonoides que interagem com o sítio benzodiazepínico e alguns deles não apresentam, ou tem apenas um leve efeito sedativo (VIOLA et al., 1995; WOLFMAN et al., 1994), e outros que possuem efeito sedativo dependente de outros sistemas neurotransmissores, como a crisina (5,7-dihidroxi-flavona) (ZANOLI et al., 2000) ou a hesperidina, que possuem efeito sedativo, mas não são ligantes do receptor benzodiazepínico GABA<sub>A</sub> (FERNÁNDEZ et al., 2005), e cujo efeito foi posteriormente atribuído à interação com o sistema opioide (LOSCALZO et al., 2008). Liao e colaboradores (2003), estudando os efeitos ansiolíticos da baicaleína, não relataram um efeito sedativo na dose de 10 mg/kg i.p., 30 min antes do teste de conflito de Vogel. Esta discrepância deve levar em consideração que os trabalhos experimentais com a baicaleína *in vivo* utilizaram vias sistêmicas como a via oral (CHENG et al., 2008) ou a intraperitoneal (WANG et al., 2004; LIAO et al., 2003) e, talvez, a perda de efeito sedativo possa ser explicada tanto pela via de administração diferente (permitindo a biotransformação do flavonoide), como pelas doses testadas e pelos diferentes protocolos experimentais usados. No tocante ao metabolismo da baicaleína, vale ressaltar que a mesma sofre metabolismo no conteúdo gástrico e cecal quando administrada pela via oral em ratos (ZHANG et al., 2007; AKAO et al., 2000). No presente trabalho, para melhor identificar seus efeitos centrais e para prevenir efeitos farmacológicos periféricos, foi utilizada apenas a via central (i.c.v.) de administração.

Considerando os parâmetros etológicos, nossos resultados com a baicaleína confirmam o perfil do tipo ansiolítico no teste do LCE, com a redução do comportamento de avaliação de risco (estiramentos corporais); medida mais sensível que os parâmetros tradicionais neste teste (RODGERS; COLE, 1994) e, um aumento no comportamento de imersões de cabeça, comportamento indicativo de atividade exploratória e, relacionado também com uma atividade do tipo ansiolítica (RODGERS; DALVI, 1997). Segundo Setem e colaboradores (1999), o que foi confirmado em nosso laboratório por Duarte e colaboradores

(2008), os parâmetros etológicos, válidos como índices de medida de “ansiedade” podem, algumas vezes, ser mais sensíveis em detectar a atividade ansiolítica de compostos que os parâmetros convencionais.

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos no teste do LCE, utilizamos o teste da placa perfurada. Este teste foi introduzido inicialmente por Boissier e Simon (1962, 1964 apud TAKEDA et al., 1998), e consiste num método simples de avaliar a resposta de um animal a um ambiente não familiar, tanto em ratos como em camundongos. No teste da placa perfurada (PP) a concentração de 2 pmol reduziu a latência para primeira imersão de cabeça. A concentração de 0,2 pmol aumentou o número de imersões, no entanto, de forma não significativa. Com relação a este último resultado, pode-se observar um efeito similar ao apresentado pelo controle positivo, que indicam atividade exploratória e também apontam para efeito do tipo ansiolítico (TAKEDA et al., 1998). Pode-se considerar que a falta de significância para esse comportamento foi devida à variância de resultados nas diferentes concentrações testadas da BC, uma vez que o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste das comparações múltiplas; mais indicado quando se tem mais de 2 grupos experimentais em escala ordinal (PHILLIPS, 1978), leva em consideração todos os grupos testados. Como houve diferença estatística entre dois grupos tratados com BC, na concentração mais baixa (0,02) tendendo a reduzir o comportamento, e na concentração intermediária (0,2 pmol) tendendo a aumentá-lo, efeitos diametralmente opostos que tendem a se anular em termos de análise global. Assim, a variação oposta entre as duas concentrações, uma tendendo para efeito sedativo e outra para ansiolítico, poderia justificar a falta de resultado significativo obtido.

Com relação aos resultados obtidos no LCE e PP, deve-se ainda considerar que testes diferentes podem ter pouca inter-relação e, dessa forma, provavelmente refletem diferentes tipos e aspectos da emocionalidade. Variações entre os testes, em um mesmo estudo, devem indicar diferenças na base teórica dos testes. Além disso, os testes animais de ansiedade são baseados em comportamentos que dependem de atividade motora e locomoção, que são requeridos de forma diferente em cada teste, o que explica porque uma medida pura de emocionalidade, desprovida de fatores não-emocionais, não é possível de ser obtida (para revisão ver RAMOS, 2008).

Alguns fármacos que atuam como ansiolíticos podem ter efeitos anticonvulsivantes, como os metabólitos da progesterona e os benzodiazepínicos, por serem moduladores alostéricos do receptor GABA<sub>A</sub> (BELELLI; LAMBERT, 2005; MÖHLER et al., 2004).

Selecionamos então um teste para investigar um possível efeito do tipo anticonvulsivante da BC, o teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol. O teste das convulsões induzida pelo PTZ é bastante utilizado no estudo das vias neuroanatômicas envolvidas no fenômeno epilético, na pesquisa de anticonvulsivantes, e na avaliação dos diversos sistemas de neurotransmissão (MELLO et al., 1986). O PTZ, inicialmente, produz espasmos mioclônicos que se tornam subsequentemente mantidos e podem levar a uma crise tônico-clônica generalizada. Sabe-se que alguns fármacos utilizados para a terapia anticonvulsiva, como a fenitoína e carbamazepina, não são eficazes contra as crises induzidas por PTZ e presume-se que fármacos efetivos contra as crises induzidas por PTZ seriam terapias antiausência em potencial, como os benzodiazepínicos e a etosuximida (DEYN et al., 1992). No nível sináptico, o PTZ interage com o complexo receptor GABA<sub>A</sub>, possivelmente no sítio de ligação da picrotoxina.

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o maior neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central. Seu receptor é uma proteína macromolecular pentamérica que contém sítios de ligação específicos, para uma variedade de fármacos como benzodiazepínicos, barbitúricos, picrotoxina e esteroides (MACDONALD; OLSEN, 1994). No entanto, como já mencionado, existem diferentes subtipos de receptor GABA<sub>A</sub> que medeiam diferentes efeitos sensíveis aos benzodiazepínicos. Do total de subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>, 60% são do tipo  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , responsáveis pelos efeitos sedativo/anticonvulsivante; 15-20% são do tipo  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ , responsáveis pelos efeitos ansiolíticos; os subtipos  $\alpha_3\beta_n\gamma_2$ , cujos efeitos ainda não são claros, correspondem a 10-15% do total e os outros 15% de subtipos restantes são considerados insensíveis aos benzodiazepínicos (MÖHLER, 2006). Como alguns flavonoides, a baicaleína também interage com o receptor GABA<sub>A</sub> ligando-se no sítio benzodiazepínico com K<sub>i</sub> de 13,1 micromol/L (LIAO et al., 1998; 2003). Apesar dos dados prévios da literatura de ligação com este receptor, nossos resultados mostraram que a baicaleína, administrada pela via intracerebroventricular, não interferiu de forma significativa com as convulsões experimentais induzidas por PTZ, embora a concentração de 0,2 pmol tenha promovido aumento na latência para a primeira convulsão, mostrando um perfil parcialmente similar ao do diazepam.

Estudos de “patch clamp” realizados com a baicalina, forma glicosilada da baicaleína, mostraram que a mesma atua como agonista seletivo parcial de receptores GABA<sub>A</sub>, sem efeito anticonvulsivante e ligando-se a receptores que contém as unidades  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  (WANG et al.,

2008). Assim, é provável que a baicaleína atue em diferentes subtipos de receptor GABA<sub>A</sub>, com diferente afinidade, ou mesmo que atue em outro sistema neurotransmissor.

No estudo de atividade do tipo-antidepressiva, selecionamos o teste da suspensão pela cauda. Este teste, quando utilizado em camundongos Swiss (BOURIN et al., 2005), detecta efeito do tipo-antidepressivo promovido por atuação em diversos sistemas: serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico. O animal é colocado numa situação inescapável, e o tempo de imobilidade neste modelo avalia o "desespero comportamental" que reflete um estado de anedonia, sensível ao tratamento com antidepressivos, como a imipramina e desipramina (STERU et al., 1985). Avaliando a atividade da BC sobre a depressão experimental, nas mesmas concentrações testadas anteriormente nos modelos de ansiedade, observamos que este flavonoide não modificou os parâmetros avaliados no teste da suspensão pela cauda, ao contrário do descrito para a apigenina, para a qual já foi demonstrado um efeito tipo-antidepressivo (NAKAZAWA et al., 2003). Cheng e colaboradores (2008) sugeriram que a BC poderia inibir parcialmente a atividade da enzima monoamino oxidase (MAO), enzima que participa do metabolismo das monoaminas envolvidas nos mecanismos de ansiedade e depressão (TAYLOR et al., 2005) e seu aumento poderia gerar uma resposta do tipo antidepressiva no teste da suspensão pela cauda. Nossos resultados negativos podem sugerir que, se essa atividade existe, a faixa de concentrações usada no presente estudo pode não ser suficiente para produzir um efeito farmacológico detectável.

Uma vez identificadas as atividades farmacológicas centrais mais proeminentes da BC, buscou-se identificar os neurotransmissores envolvidos nos seus efeitos sedativo e tipo-ansiolítico, iniciando pelo sistema GABA-benzodiazepínico. Em relação ao sítio BDZ, verificou-se o pré-tratamento com o flumazenil se mostrou eficaz em antagonizar parcialmente os efeitos ansiolíticos do DZP e não promoveu efeito *per se* em nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, o pré-tratamento com flumazenil não foi capaz de bloquear todos os efeitos do tipo ansiolítico da baicaleína no teste do LCE. O FMZ bloqueou o aumento das imersões de cabeça induzidos pela BC, sugerindo um antagonismo parcial. Curiosamente, em contraste com os dados mostrando que a BC *per se* não interferiu com as entradas nos braços fechados, o pré-tratamento com o FMZ reduziu o número de entradas nos braços fechados, quando comparado aos animais que foram pré-tratados com salina e tratados com BC, indicando uma redução da atividade motora

dos animais pré-tratados, o que pode ter interferido com o comportamento de imersão de cabeça. Esse resultado sugere que o bloqueio do receptor benzodiazepínico parece promover um aumento do efeito sedativo da BC, talvez por permitir sua interação com um sítio secundário envolvido com seu efeito sedativo. Assim prosseguimos o estudo investigando as consequências do antagonismo do FMZ também sobre o efeito hipno-sedativo da BC no teste do sono etéreo. O pré-tratamento com FMZ não foi capaz de impedir a potencialização do sono induzida pelo tratamento com a BC.

Traçando uma comparação com um benzodiazepínico clássico, o DZP, observamos que o pré-tratamento com FMZ não altera nenhum dos efeitos deste benzodiazepínico nos parâmetros clássicos do teste do LCE, pois, embora o flumazenil tenha reduzido alguns efeitos do DZP, não o fez de forma estatisticamente significativa. No teste do sono etéreo, o pré-tratamento com FMZ reduziu o tempo de sono induzido pelo DZP, mas novamente não atingiu significância. Liao e colaboradores (2003) mostraram que a BC (10 mg/kg, i.p.) e seu glicosídeo, a baicalina (20 mg/kg, i.p.), produzem um efeito do tipo ansiolítico no teste do conflito de Vogel, que é antagonizado pelo pré-tratamento com FMZ (2 mg/kg, i.p.), mas não pelo antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub> pindolol. Essa hipótese foi confirmada pelo estudo de Wang e colaboradores (2008) e pode ser explicada pelos ensaios de *binding* indicando que a BC interage com o sítio benzodiazepínico no complexo GABA<sub>A</sub> em preparações com córtex de camundongo, com um K<sub>i</sub> de 13,1  $\mu$ M (LIAO et al., 1998). Os pesquisadores concluíram então que esse efeito do tipo ansiolítico pode ser mediado pela ativação do sítio benzodiazepínico presente nos receptores GABA<sub>A</sub>. Nossos resultados corroboram parcialmente os da literatura uma vez que apenas o comportamento de imersões de cabeça foi antagonizado pelo flumazenil, mas não o tempo e as entradas nos braços abertos, ambos índices clássicos de medida do comportamento aversivo eliciado no teste do LCE (RODGERS; COLE, 1994). Vale ressaltar que estas diferenças podem ser atribuídas às diferenças entre os protocolos experimentais nos diversos estudos, como a espécie animal usada, as vias de administração para a BC e o tempo de pré-tratamento para o antagonista, que no trabalho de Liao e colaboradores (2003) foi co-administrado sistemicamente com a BC, 30 min antes do teste. Novamente, devemos considerar que os parâmetros etológicos podem, algumas vezes, ser mais sensíveis que os parâmetros convencionais (DUARTE et al., 2008; SETEM et al, 1999). Por outro lado, nossos dados podem ser atribuídos a uma dose subefetiva de flumazenil,

incapaz de antagonizar completamente os efeitos da BC. A este respeito, experimentos prévios em nosso laboratório mostraram que a dose de 1 mg/kg i.p. de FMZ foi a mais eficiente em reverter os efeitos ansiolíticos do DZP, e também da BC, em comparação com as doses de 2 e 10 mg/kg i.p. também testadas, embora somente o parâmetro imersões de cabeça tenha sido revertido, tanto nos animais tratados com DZP como nos tratados com BC (ver apêndice C). Dados prévios de nosso laboratório de pré-tratamento com FMZ mostram resultados semelhantes aos observados em nossos experimentos (DUARTE et al., 2008). Nossos resultados vão ainda de encontro aos apresentados por Dalvi e Rodgers, em 1999. Os mesmos observaram que embora um número significativo de trabalhos relate o aparente bloqueio da ansiólise do diazepam pelo FMZ, seus experimentos demonstraram que, com exceção do comportamento de imersões de cabeça, o FMZ, mesmo em doses altas (10 e 40 mg/kg) não bloqueava os efeitos do DZP. Estes autores sugerem que os efeitos tipo-ansiolíticos do DZP em camundongos avaliados no LCE não são modulados por sítios sensíveis ao FMZ, devendo-se considerar outros mecanismos de ação.

Para melhor compreender a interação da BC com o sítio BDZ, investigamos a interação da mesma com o DZP. Ambos em concentração/dose subefetivas, baseados em experimentos prévios no teste do LCE ou teste do sono etéreo, em busca de um sinergismo entre estes compostos que possa explicar os resultados obtidos. Os parâmetros clássicos do LCE não foram alterados pelo pré-tratamento com DZP (0,25 mg/kg, i.p.) ou pelo tratamento da BC (0,002 pmol/2 µl, i.c.v.). A administração conjunta de DZP e BC não foi também capaz de modificar de forma significativa esses parâmetros no LCE. Embora tenha aumentado de forma não significativa o tempo e entradas nos braços abertos do LCE, sugerindo uma interação entre os compostos, mas não suficiente para promover um efeito tipo-ansiolítico evidente e significativo.

Por outro lado, o DZP, como pré-tratamento, aumentou o número de entradas nos braços fechados e o total de entradas nos braços. Este efeito estimulante motor do DZP, nessa dose baixa, já havia sido atribuído à ativação do sistema dopaminérgico, tendo sido bloqueado pelo FMZ, por um inibidor da síntese de catecolaminas, a alfa-metiltirosina e pelo antagonista do receptor da dopamina, o haloperidol (SÖDERPALM et al., 1991). A BC em concentrações subefetivas não alterou o número de entradas nos braços fechados ou número total de entradas. O tratamento DZP+BC não interferiu com as entradas nos braços fechados, mas manteve o aumento no número total de entradas.



Este fato pode ser explicado pelo número total de entradas, que é a soma do efeito das concentração/dose subefetivas de BC e DZP, e embora a BC e o DZP não tenham modificado o número de entradas nos braços abertos e o DZP tenha aumentado apenas o número de entradas nos braços fechados, juntos ambos aumentaram o número de entradas nos braços abertos, embora de forma não significativa. Assim o tratamento DZP+BC promoveu um aumento no número de entradas totais, o que não foi observado para ambos quando em separado, e que passou a mostrar esse efeito sinérgico de DZP+BC quando comparado ao tratamento Co+BC. Esse resultado pode ser explicado pela ocupação prévia dos sítios BDZ pelo DZP, que a BC não pôde deslocar ou ainda em caso de agirem em outros sítios, por um efeito sinérgico. Relativamente aos parâmetros etológicos, pode-se observar interação sinérgica apenas nos comportamentos de imersões de cabeça, sugestivos de atividade exploratória (RODGERS; DALVI, 1997).

Os presentes resultados sugerem, portanto, que outro sítio insensível ao FMZ no complexo GABA<sub>A</sub> ou outro sistema neurotransmissor, poderia estar envolvido nesses efeitos observados para a BC, como já descrito para outros compostos provenientes de plantas (DUARTE et al., 2008).

Cheng e colaboradores (2008) descreveram que a BC exerce um efeito protetor nos danos promovidos por 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) em camundongos. Os pesquisadores verificaram também que a BC aumentou os níveis de dopamina, de seu metabólito ácido homovanílico (HVA) e de serotonina, além de reduzir o estresse oxidativo, sugerindo que a BC pode inibir parcialmente a atividade da enzima monoamino oxidase (MAO), atividade já descrita para a apigenina (HAN et al., 2007). Como a MAO é responsável pelo metabolismo de catecolaminas e a MAO-B, particularmente, é responsável pela transformação do MPTP em seu íon tóxico, o 1-metil-4-fenilpirininium (MPP<sup>+</sup>), que induz à formação de espécies reativas de oxigênio, isto poderia explicar seu efeito na redução do estresse oxidativo. Talvez essa atividade da BC possa explicar o efeito do tipo ansiolítico da BC, visto que drogas que afetam o sistema serotoninérgico produzem efeitos ansiolíticos no teste do LCE (YU et al., 2007; RODGERS; COLE, 1994).

Procedemos então a investigação do efeito do tipo ansiolítico da BC com um depletor de serotonina, o PCPA (TENEN, 1967). O PCPA não produziu efeito *per se* e também não foi capaz de bloquear o efeito da BC. Os índices de atividade motora também não foram modificados por este tratamento. Entretanto, a BC elevou os comportamentos de

levantar e o pré-tratamento com a PCPA impediu esse efeito, sendo que esse comportamento é usado como um índice de atividade exploratória vertical (RODGERS; DALVI, 1997; CRUZ et al., 1994). Esse resultado sugere que o sistema serotoninérgico não está envolvido com a atividade tipo-ansiolítica da BC no LCE, mas pode estar envolvido com seus efeitos motores. A este respeito, Tenen (1967) relatou que a depleção de serotonina em ratos Sprague-Dawley produz uma redução na atividade motora e que este efeito não deve ser confundido com um efeito sedativo ou tranquilizante. Nossos resultados mostram que a PCPA não apresenta efeito *per se* na dose utilizada e o efeito observado é provavelmente devido à participação da serotonina no efeito motor da BC.

Na tentativa de identificar outros possíveis sítios de ação da BC no complexo receptor do ácido aminobutírico do tipo A (GABA<sub>A</sub>), foi utilizado o pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista não competitivo do complexo GABA<sub>A</sub> (MACDONALD; OLSEN, 1994). O pré-tratamento com PTZ impediu o efeito tipo-ansiolítico da BC, demonstrado pela redução no tempo e entradas nos braços abertos, além de redução do número de imersões de cabeça quando comparado ao grupo tratado só com BC. O PTZ liga-se competitivamente ao complexo GABA<sub>A</sub>, agindo como antagonista, via interação com seu sítio alostérico localizado no canal de cloreto, de forma similar a picrotoxina, porém num domínio de interação diferente (HUANG et al., 2001). Esse bloqueio indica que o efeito tipo-ansiolítico da BC depende, pelo menos em parte, do sistema GABAérgico. O antagonismo do efeito do tipo-ansiolítico da BC, pelo PTZ, somado a falta de efeito anticonvulsivante da BC no teste das convulsões induzidas por PTZ, podem sugerir sítios moduladores diferentes para PTZ e BC, ou preferência por outro subtipo de receptores no receptor GABA<sub>A</sub>, e que estejamos diante de um antagonismo farmacológico não competitivo.

Os receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> são constituídos subunidades protéicas e existem 19 subunidades ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  e  $\rho$ 1-3) possíveis para compor os receptores e potencialmente, milhares de subtipos distintos de receptores GABA<sub>A</sub>, distribuídos de forma heterogênea no sistema nervoso central (SIMON et al., 2004). No entanto, estimativas recentes indicam que existem cerca de 30 subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>, cada qual com padrões característicos e propriedades farmacológicas e fisiológicas particulares (SIEGHART; SPERK, 2002). Alguns esteroides naturais podem interagir com alguns desses receptores como moduladores alostéricos, potencializando a transmissão GABAérgica e produzindo efeitos de importância clínica,

como efeitos ansiolítico, sedativo e anestésico. Os neuroesteroides modulam o receptor GABA<sub>A</sub> em sítios específicos para neuroesteroides (GIBBS et al., 2006). Tradicionalmente, sugere-se que neuroesteroides se liguem preferencialmente aos receptores que contém subunidades  $\delta$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  e  $\beta 1$  (BELELLI; LAMBERT, 2005). Para investigar a possível relação da BC com o sítio de neuroesteroides, selecionamos para pré-tratamento a dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), um neuroesteroide que modula negativamente o receptor GABA<sub>A</sub> (HIRANI et al., 2005), por interagir com um sítio próximo ao sítio TBPS (t-butilbiciclofosforotionato)/picrotoxina (SOUZA; TICKU, 1997).

O pré-tratamento com a DHEAS bloqueou o efeito tipo-ansiolítico da BC. Embora os dados da literatura sejam discrepantes quanto ao efeito da DHEAS em testes de ansiedade, mostrando resultados tanto ansiolíticos (MELCHIOR; RITZMANN, 1994), como ansiogênicos (REDDY; KULKARNI, 1997), há dados que corroboram os aqui obtidos, onde a DHEAS, em ratos, na dose de 1 mg/kg, i.p., foi capaz de impedir o efeito tipo-ansiolítico do etanol no teste do LCE, ou aumentar a ansiedade induzida pela cafeína sem apresentar efeito *per se* (HIRANI et al., 2005; JAIN et al., 2005).

Com relação aos parâmetros de locomoção, mostramos que a DHEAS aumentou *per se* o número de entradas nos braços fechados, mas não modificou esse parâmetro no grupo que recebeu BC como tratamento, a qual não interferiu com a atividade motora. O parâmetro número total de entradas seguiu o mesmo padrão, a DHEAS aumentou *per se* o número total de entradas, mas não modificou esse parâmetro no grupo tratado com BC, o qual se manteve similar ao grupo controle. Relatos em ratos sugerem que a DHEAS não modula *per se* a locomoção devido aos baixos níveis de neuroesteroides em ratos machos (HIRANI et al., 2005; JAIN et al., 2005). Nossos experimentos foram realizados com fêmeas em fase de diestro, onde elas respondem aos benzodiazepínicos e outros compostos utilizados em modelos comportamentais de forma semelhante aos machos, no entanto não podemos desconsiderar que as variações dos hormônios ovarianos modificam as respostas das fêmeas ao estresse (BITRAN; DOWD, 1996), e que as mesmas podem, neste caso, responder de forma diferente ao tratamento com DHEAS. Skilbeck e colaboradores (2008), mostraram, por exemplo, que os sítios GABAérgicos, nas regiões cerebrais corticais, podem ser modificados pelo estresse, em direções opostas em machos e fêmeas de roedores.

Com relação ao número de imersões de cabeça, houve um aumento no grupo tratado com a BC e um bloqueio deste pelo pré-

tratamento com a DHEAS, mostrando o antagonismo sobre esse parâmetro indicativo de atividade exploratória (RODGERS; DALVI, 1997).

Com relação ao número de estiramentos corporais, embora o pré-tratamento com a DHEAS ou o tratamento com BC não tenham modificado este parâmetro, no grupo DHEAS+BC houve um aumento no número de estiramentos. Esse resultado pode estar relacionado à atividade da DHEAS como modulador alostérico positivo do receptor NMDA (MONNET et al., 1995), pois, apesar de não promoverem efeito *per se* nas concentrações/doses usadas, pode ter havido potencialização dos efeitos quando administrados conjuntamente. Podemos sugerir que o tratamento com a BC e a DHEAS possibilita uma inibição de alguma via, e que permita a observação do efeito tipo-ansiolítico da DHEAS, como por exemplo, a ocupação do mesmo sítio no GABA<sub>A</sub> por efeito agonista competitivo, ou o deslocamento da DHEAS para o receptor NMDA. Nossos resultados mostram que o sítio de neuroesteroides no complexo receptor GABA<sub>A</sub> está envolvido no efeito tipo-ansiolítico da BC, e poderíamos sugerir a existência de um antagonismo competitivo, no entanto mais experimentos seriam necessários para afirmar esta hipótese.

Em continuidade aos estudos com a baicaleína, nosso estudo de estrutura-atividade tipo-ansiolítica teve como objetivo identificar uma atividade tipo-ansiolítica para flavonoides estruturalmente relacionados à BC, no sentido de melhorar o entendimento acerca de flavonoides com atividade do tipo-ansiolítico e identificar e entender quais conformações estruturais são preditivas de um efeito tipo-ansiolítico. Optou-se por biomonitorar este efeito no teste do LCE, por ser o teste onde obtivemos resultados do tipo-ansiolítico significantes durante a investigação da atividade farmacológica da BC. Baseados na extensa curva concentração-resposta para a BC que realizamos neste estudo e, de acordo com resultados prévios realizados com outros flavonoides em nosso laboratório (dados não mostrados), selecionamos as concentrações mais promissoras para seguir com o estudo da relação estrutura-atividade. Foram selecionadas então duas concentrações para as flavonas com mais semelhança estrutural à BC e, apenas uma concentração para as flavonas já descritas na literatura ou para os flavonóis.

Dos dez flavonoides testados, apenas a galangina (3,5,7-trihidroxi-flavona) não modificou nenhum dos parâmetros registrados no LCE, na concentração de 0,2 pmol, i.c.v. Esse resultado não descarta a possibilidade de efeito central para a galangina, no entanto, descartamos

a possibilidade de efeito na concentração, tempo e via testados, sugerindo não haver nenhuma atividade tipo-ansiolítica de forma similar a descrita para a BC. Esse achado pode justificar e esclarecer o motivo da ausência de literatura relatando qualquer atividade comportamental para o flavonoide galangina. No entanto, mais estudos com uma faixa maior de concentrações são necessários antes de descartar completamente este composto.

Os outros nove flavonoides mostraram algum grau de atividade do tipo ansiolítica, seja em uma ou nas duas concentrações testadas.

Considerando o parâmetro entradas nos braços abertos, foram obtidos resultados significativos para a 7,8-dihidroxiavona (7,8-DH) (0,02 e 0,2 pmol), 6-hidroxiavona (6-H) (0,02 e 0,2 pmol) e 6-metoxiavona (6-M) (0,2 pmol), sendo que a 6-M demonstrou resultados similares aos obtidos para o controle positivo DZP. A 5,7-dihidroxiavona (5,7-DH), 7-hidroxiavona (7-H), apigenina (AP) (4',5,7-trihidroxiavona), 6,7-dihidroxiavona (6,7-DH), quercetina (QC) (3,3',4',5,7-pentahidroxiavona) e luteolina (LT) (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) também aumentaram o número de entradas nos braços abertos, na concentração de 0,2 pmol.

Para o tempo despendido nos braços abertos, nenhuma diferença significativa foi observada nos animais tratados com 7-H. Foram observados resultados significativos para a 7,8-DH (0,02 e 0,2 pmol), 5,7-DH (0,02 e 0,2 pmol), 6-H (0,02 pmol), e para a 6-M, 6,7-DH, AP, LT e QC, na concentração de 0,2 pmol.

Com relação ao número de imersões de cabeça, todos os flavonoides testados, com exceção da GL, aumentaram o número de comportamentos de avaliação de risco, confirmando o efeito do tipo-ansiolítico para os mesmos.

Nenhum dos flavonoides testados foi capaz de modificar o número de entradas nos braços fechados ou o número total de entradas no LCE, mostrando que os mesmos são desprovidos de efeito sedativo *per se*.

No tocante aos parâmetros etológicos, para os estiramentos corporais, apenas a 6-M promoveu redução deste comportamento nas duas concentrações testadas, reforçando os resultados obtidos nos parâmetros clássicos do teste. Vale ressaltar que os seguintes flavonóides testados: 7,8-DH, 5,7-DH, GL, AP, LT e QC, nenhuma diferença foi observada nos estiramentos corporais, assim como para o grupo controle positivo DZP, em virtude do reduzido número deste comportamento também observado no grupo controle. Para os comportamentos de levantar, indicativos de atividade exploratória

vertical (RODGERS; DALVI, 1997), as duas concentrações de 6-H e a concentração mais baixa de 6,7-DH promoveram um aumento significativo deste comportamento. Nenhuma diferença significativa foi observada para os demais flavonoides testados ou mesmo para os grupos controle DZP no comportamento de levantar. Nenhum flavonoide ou controle positivo modificou os comportamentos de autolimpeza.

De forma geral, podemos considerar que os flavonoides 7,8-DH, 5,7-DH, 6-M, 7-H, 6-H, 6,7-DH, AP, QC e LT, mostraram uma atividade tipo-ansiolítica, quando administrados, pela via i.c.v., em camundongos fêmeas, no teste do LCE. Por outro lado a GL não foi capaz de mostrar qualquer atividade na concentração e via testada. Esta atividade deve-se certamente à ação central destes compostos, embora não se possa determinar uma ordem precisa de eficácia ou potência, devido a não realização de uma curva concentração-resposta para os flavonoides.

Conforme já descrito na introdução da presente tese, existem alguns trabalhos demonstrando a atividade central para alguns dos flavonoides aqui estudados. Nesta discussão nos deteremos aos estudos comparativos com o intuito de estabelecer uma relação entre a estrutura e a atividade farmacológica tipo-ansiolítica no teste do LCE.

Atualmente modelos preditivos para atividades farmacológicas são uma alternativa importante ou uma ferramenta complementar para os ensaios convencionais e podem reduzir o uso de animais, o tempo e os custos empregados na identificação de novas substâncias com atividade terapêutica. Entre esses métodos está o estudo da relação estrutura-atividade (SAR) (DINIZ et al., 2007). Esses estudos, quando usados para flavonoides com o intuito de determinar sua ligação ao sítio benzodiazepínico, mostram que os derivados das flavonas podem exibir atividade ansiolítica devido à interação com o este sítio.

O sítio benzodiazepínico está localizado na interface das subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$ , na composição proteica pentamérica do receptor GABA<sub>A</sub> (MÖHLER et al., 2006). Modelos moleculares de análise de SAR estabelecem algumas características para possibilitar essa interação e descreve a relevância de efeitos elétricos no *binding* do ligante, além de explicar melhor alguns resultados observados em experimentos de *binding* (DEKERMENDJIAN et al., 1999; MARDER et al., 2001). O modelo do farmacóforo (ZHANG et al., 1995) sugere que agonistas, antagonistas e agonistas inversos podem ter o mesmo receptáculo no receptor benzodiazepínico e que, portanto, flavonoides com alta afinidade ao receptor benzodiazepínico *in vitro* abrangem desde agonistas até agonistas inversos. As propriedades de ligação dos

flavonoides ao receptor podem ser racionalizadas por este modelo, sugerindo que uma interação com o sítio receptor depende da forma como ele interage eletricamente com as regiões de ligação do farmacóforo. As regiões denominadas H1 e A2 do farmacóforo são regiões doadoras de pontes de hidrogênio e sítio receptor, respectivamente; enquanto H2/A3 é uma região tanto receptora como doadora de pontes de hidrogênio. L1, L2, e L3 são áreas lipofílicas e, S1, S2, e S3 são regiões de interação estérico negativas (ZHANG et al. 1995). Sugere-se que o farmacóforo para flavonas possui uma região L3 pequena e uma região L2 maior, e que a região A2 não é necessária para o *binding* de flavonas. As regiões L2 ou L3 estão relacionadas à interação com a posição C-6 das flavonas (DEKERMENDJIAN et al. 1999; MARDER et al., 2001).

De acordo com Dekermendjian e colaboradores (1999) a afinidade de uma flavona ao farmacóforo aumenta quando o substituinte na posição C-6 é menos polar e as flavonas que não contém substituintes nas posições C-3 ou C-2' possuem estruturas mais planares e interagiriam com o receptor benzodiazepínico mais facilmente (ZHANG et al. 1995; MARDER et al., 2001). Outras modificações moleculares ainda não estudadas neste modelo, como a presença de uma ou mais hidroxilas em diferentes posições, como as aqui testadas, podem interferir com a interação flavonoide no sítio BDZ. Marder e colaboradores (2001) e Wang e colaboradores (2005) descreveram, por exemplo, os eventos eletrônicos do átomo de oxigênio carregado negativamente no grupo carbonil do flavonoide, assim como a natureza dos substituintes na posição C-6 ou C-3' do núcleo da flavona, como as posições mais efetivas para se colocar substituintes e, portanto, como um dos responsáveis por essa afinidade ao sítio benzodiazepínico. Além disso, substituintes na posição C-7 não fornecem uma contribuição positiva para a afinidade devido ao tamanho do receptor e as dimensões do ligante. Também determinaram novas regiões que seriam mais importantes para a interação das flavonas: uma região H, uma região ER, uma L e três S.

Com relação à estrutura-atividade comportamental do tipo ansiolítica, nossos resultados mostram que a presença de um substituinte ou um grupo hidroxil livre em C-6 não é essencial para um efeito tipo-ansiolítico, como observado para 5,7-DH, 7,8-DH e 7-H; mas parece contribuir para tornar o composto mais ativo, como visto na 6-M e 6-H. As flavonas AP, QC e LT, que têm mais grupos hidroxil (-OH) no anel B, mostraram um efeito similar tipo-ansiolítico quando comparados aos flavonoides sem hidroxilas no anel B (6-M, 6-H, 7-H, 5,7-DH e 7,8-

DH). A AP tem uma hidroxila no anel B, e a LT e a QC tem duas hidroxilas cada. Parece que a -OH no anel B não é importante para a atividade tipo-ansiolítica e embora o aumento de grupos hidroxila aumente a polaridade dos compostos, não afeta a distribuição e a ligação a um sítio ativo. As diferenças entre a AP (4',5,7-trihidroxi-flavona) e LT (3',4',5,7-tetrahidroxi-flavona) é a -OH no C-3' (anel B). As diferenças entre LT e QC (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) é o grupo -OH no C-3 (anel C). Os três flavonoides têm em sua estrutura básica uma 5,7-DH. Contudo a GL também tem uma 5,7-DH em sua estrutura, além de um -OH em C-3 (anel C) e não teve nenhum efeito seja comportamental ou nos ensaios de *binding*. A hidroxila presente em C-3' e C-4' da QC, é a diferença entre QC e GL. É possível que os substituintes no anel B, em C-3' e/ou C-4', especialmente em C-4', sejam importantes para uma atividade tipo-ansiolítica, embora não sejam essenciais; e que os flavonóis não sejam mais tipo-ansiolíticos que as flavonas.

Embora possamos relacionar a ocupação do sítio benzodiazepínico às atividades encontradas, não podemos considerar que este é o único fator determinante da atividade do tipo ansiolítica descrita para estes compostos. Em ensaios preliminares de *binding* para testar a possível ação dos flavonoides aqui testados, como moduladores do BDZ-R, mostramos que a 6,7-DH e a 7,8-DH foram capazes de deslocar o  $^3\text{H}$ -FNZ, com uma porcentagem de inibição de 90% e 100%, respectivamente, o que sugere uma atividade central para estes compostos. Por outro lado a GL não inibiu o *binding* de [ $^3\text{H}$ ]-FNZ ao sítio de ligação benzodiazepínico até uma concentração de 300  $\mu\text{M}$ , não mostrando afinidade ao receptor benzodiazepínico. Descrevendo os dados da literatura para o  $K_i$  dos flavonoides testados, em ordem decrescente de afinidade, podemos ter uma idéia comparativa das afinidades pelo sítio benzodiazepínico: 6-H:  $K_i = 0,580 \mu\text{M}$  (AI et al., 1997); 6-M:  $K_i = 0,860 \mu\text{M}$  (AI et al., 1997); 5,7-DH:  $K_i = 3 \mu\text{M}$  (MEDINA et al., 1990); AP (4',5,7-trihidroxi-flavona):  $K_i = 4 \mu\text{M}$  (VIOLA et al., 1995); 7,8-DH:  $K_i = 4,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$  (n=3) (segundo nossos resultados); 7-H:  $K_i = 5,3 \mu\text{M}$  (AI et al., 1997); 6,7-DH:  $K_i = 11,7 \pm 1,8 \mu\text{M}$  (n=3) (segundo nossos resultados); LT (3',4',5,7-tetrahidroxi-flavona):  $K_i = 60,1 \mu\text{M}$  (COLETA et al., 2008); QC (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona):  $K_i = > 100 \mu\text{M}$  (VIOLA et al., 1994) e GL (3,5,7-trihidroxi-flavona): não estabelecido na literatura ou nos nossos resultados de *binding*, devido a baixa porcentagem de inibição de ligação do  $^3\text{H}$ -FNZ ao BDZ-R. Podemos observar que existe uma



relação direta entre a afinidade ao sítio BDZ e atividade do tipo-ansiolítica, embora exista uma grande variação de afinidade pelo receptor. No entanto, deve-se considerar que a BC, já descrita com grau de afinidade ao sítio benzodiazepíco com  $K_i = 13,1 \mu\text{M}$  (LIAO et al., 1998), não teve seu efeito do tipo ansiolítico antagonizado pelo FMZ. Além disso os resultados se tornam mais inconclusivos quando consideramos que a concentração de DZP utilizada como controle positivo no teste do LCE é de  $7 \text{ nmol}$  ( $10^{-9} \text{ mol}$ ), e que os flavonoides foram testados na concentração de  $0,02$  e  $0,2 \text{ pmol}$  ( $10^{-12} \text{ mol}$ ). Enquanto o  $K_i$  para ligação com o sítio benzodiazepínico descrito para o DZP é de  $0,007 \mu\text{M}$  (MARDER et al., 2001), muito inferior aos encontrados na literatura para os flavonoides testados. Pode-se considerar que a afinidade encontrada para alguns dos flavonoides testados não é suficiente pra justificar seu efeito do tipo-ansiolítico, e que muitos dos efeitos descritos para eles não são antagonizados por antagonistas do sítio BDZ (AVALLONE et al, 2000; COLETA et al., 2008; ZANOLI et al., 2000).

Mas não podemos deixar de mencionar que algumas observações relativas ao estudo do farmacóforo explicam, por exemplo, a baixa afinidade da QC (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) ao sítio BDZ e talvez a ausência de efeito para a GL (3,5,7-trihidroxiflavona). Entre outras interações elétricas, ambas possuem hidroxilas como substituintes na posição C-3, indicando talvez menor potência na interação com o sítio benzodiazepínico e, portanto, menor atividade do tipo benzodiazepínicas, tais como efeitos ansiolítico, sedativo e anticonvulsivante (DEKERMENDJIAN et al., 1999).

Dekermendjian e colaboradores (1999) também realizaram ensaios de "GABA ratio", no qual dividindo o valor de  $K_i$  de cada composto, obtido no *binding* sem GABA, pelo  $K_i$  na presença de GABA, obtiveram um valor segundo a qual pode-se indicar a eficácia de ligação ao receptor BDZ. A relação-GABA  $>1$  indicariam que o composto tem um perfil agonista; a relação-GABA  $< 1$  indicaria compostos com perfil de agonista inverso; e a relação-GABA  $\sim 1$  indica um perfil antagonista. Segundo o autor, ensaios com as flavonas aqui testadas indicaram que a 6-M teria uma atividade agonista (relação= $1,51 \pm 0,16$ ), 7-H teria uma atividade agonista menos expressiva ( $1,14 \pm 0,08$ ), 6-H teria ação antagonista ( $1,06 \pm 0,10$ ) e 5,7-DH teria um perfil agonista inverso ( $0,90 \pm 0,11$ ). Esses resultados poderiam explicar o efeito ansiolítico obtido para a 6-M, mas não os obtidos para a 6-H e 5,7-DH.

Um fator importante para a atividade biológica de uma substância é sua capacidade de atravessar as membranas biológicas, uma vez que essa capacidade pode determinar como a substância atinge o alvo farmacológico. Agrupando os flavonoides com seu peso molecular em ordem decrescente, de acordo com os resultados obtidos no LCE, não observamos qualquer correlação entre peso molecular e efeito observado: 6-M: 252,27; 7,8-DH: 254,22; 5,7-DH: 254,23; 7-H: 238,26; AP (4',5,7-trihidroxiflavona): 270,24; 6,7-DH: 254,22; 6-H: 238,26; QC (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona): 302,24; LT (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona): 286,24 e GL (3,5,7-trihidroxiflavona): 270,24. Naturalmente, as características eletrônicas e hidrofóbicas das estruturas é que são as principais determinantes da capacidade de circular pelos fluidos extracelulares e penetrar nas membranas biológicas. A técnica de “biopartitioning micellar chromatography” (BMC), que utiliza colunas capilares como ferramenta para *screening*, fornece informações sobre absorção oral, permeabilidade cutânea e permeabilidade na barreira hemato-encefálica (BHE), devido às similaridades entre o sistema cromatográfico e as barreiras de fluidos extracelulares biológicos. Segundo Diniz e col. (2007), um estudo com diversos compostos polifenólicos mostrou que a 7-H tem um coeficiente de distribuição na barreira-hemato encefálica (log BB) de 0,153, enquanto a AP e a QC de 0,152, e a 5-H de 0,484. A análise de coeficientes do modelo proposto implica que a passagem de compostos neutros ou catiônicos e hidrofóbicos tem o transporte pela BHE favorecido e que os compostos polifenólicos podem ser classificados de fracos a fortes atravessadores da BHE. Considerando que as substâncias com log BB maior que “0” podem se concentrar preferencialmente no cérebro, pode-se afirmar que os flavonoides citados podem cruzar passivamente a barreira hemato-encefálica. Contudo, os testes de BMC, por serem voltados para o transporte passivo nas membranas celulares, apresentam algumas lacunas e podem falhar no caso de compostos que são transportados ativamente por transporte paracelular ou quando estão envolvidos processos metabólicos (DINIZ et al., 2007), como descrito para os diversos flavonoides, como a baicaleína (AKAO et al., 2000; WALLE, 2004).

Considerando os sistemas não-benzodiazepínicos como alvo de ação dos flavonoides, sabemos que os esteroides interagem com o complexo GABA em diferentes sítios (GIBBS et al., 2006). Assim, podemos sugerir que a atividade estrogênica dos flavonoides pode mediar sua atividade tipo-ansiolítica. Choi e colaboradores (2008) mostraram que a AP (4',5,7-trihidroxiflavona) e a 5,7-DH apresentam

modesta afinidade de ligação aos receptores de estrogênio e que a afinidade por esses receptores se deve a presença de grupos hidroxil na posição C-4' e C-7, enquanto a presença de grupos hidroxil na posição orto parece reduzir a estrogenicidade. A este respeito, a posição do grupo hidroxila e o anel B parece ser um ponto crítico na atividade inibitória sobre a enzima 3-hidroxiesteroide desidrogenase envolvida na síntese de hormônios esteroides. A 6-H, que possui uma hidroxila na posição C-6 semelhante ao esteroide dehidroepiandrosterona, tem forte atividade inibitória sobre a enzima 3-hidroxiesteroide desidrogenase ( $K_i = 0,19 \mu\text{M}$ ) (OHNO et al., 2004). Baseados em nossos dados comportamentais, podemos sugerir que a 6-H talvez atue diretamente em sítios para neuroesteroides ou, indiretamente, modulando a síntese de hormônios esteroidais. A modulação destes últimos pode, por sua vez, modular a ansiedade. A 6-M possui uma atividade inibitória mais discreta, a 7-H não possui atividade, e AP e 5,7-DH, ambas com uma hidroxila na posição C-7, têm fraca atividade inibitória sobre a enzima 3-hidroxiesteroide desidrogenase (OHNO et al., 2004). Essas considerações podem ser de alguma valia quando consideramos o uso sistêmico para os flavonoides estudados. No caso da via i.c.v., podemos apenas considerar um efeito direto nos sítios para esteroides presentes no complexo  $\text{GABA}_A$ . De acordo com Brot e colaboradores (1997), um dos possíveis mecanismos de ação da alopregnanolona é a ligação ao sítio da picrotoxina, no complexo  $\text{GABA}_A$  (SOUZA; TICKU, 1997). Nossos resultados mostraram que tanto o PTZ como a DHEAS, que se ligam a um sítio próximo ao da picrotoxina, impedem o efeito tipo-ansiolítico da BC, reforçando a hipótese de ação via receptor para esteroides.

De forma geral, os resultados apresentados no presente trabalho corroboram com os demais trabalhos acerca dos efeitos centrais produzidos pela flavona baicaleína e flavonoides a ela relacionados. No entanto, este trabalho é o primeiro a mostrar os efeitos da administração central da baicaleína no comportamento de camundongos fêmeas nos testes do sono induzido por éter, teste do labirinto em cruz elevado, teste da placa perfurada, teste da suspensão pela cauda e das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol. Mostramos ainda seus efeitos centrais, seus efeitos hipno-sedativo e tipo-ansiolítico independentes de qualquer interferência metabólica sistêmica, como sua transformação à baicalina. Mostramos ainda que seus efeitos, tanto sedativo e do tipo-ansiolítico, são independentes da atuação no sítio  $\text{GABA}_A$ -érgico-benzodiazepínico sensível ao flumazenil. Seu efeito tipo-ansiolítico é modulado provavelmente pelos receptores  $\text{GABA}_A$ -érgicos do tipo A via sítios do

pentilenotetrazol e dos neuroesteroides, espacialmente localizados próximos ao sítio da picrotoxina. Observamos também, que o sistema serotoninérgico não está envolvido no efeito tipo-ansiolítico da BC, mas este sistema parece estar envolvido no efeito da BC sobre a atividade locomotora. Em resumo, verificamos que a baicaleína apresenta potencial terapêutico nos transtornos de ansiedade.

Além disso, o estudo da relação estrutura-atividade mostrou o potencial farmacológico dos flavonoides estruturalmente relacionados à BC para o tratamento de patologias relacionadas à ansiedade. Dentre os flavonoides estudados somente a galangina (3,5,7-trihidroxi-flavona) se mostrou desprovida de efeito tipo-ansiolítico. Esses achados foram corroborados pelos ensaios de *binding* ao receptor BDZ, que mostraram a afinidade dos flavonoides 6,7-DH e 7,8-DH, e a baixa afinidade da GL, sugerindo haver uma correlação entre efeito tipo-ansiolítico e a ligação ao sítio benzodiazepínico. Nossos achados comportamentais com os flavonoides testados podem ser atribuídos à presença de substituintes nas posições C-6, no caso da 6,7-DH e 6-M, por exemplo, e no caso da GL, à ausência de substituintes C-6 e a presença de hidroxilas na posição C-3 e um substituinte na posição C-7, que interferem com a ligação ao sítio BDZ devido às interações estéricas entre o volume do receptor e o tamanho do ligante, conforme descrito em ensaios *in vitro* (DEKERMENDJIAN et al., 1999; MARDER et al., 2001). Embora essas interações com o sítio BDZ não possam explicar completamente os efeitos centrais encontrados para todos os flavonoides aqui testados. Corroborando os ensaios *in vitro*, os resultados comportamentais mostram que um substituinte ou um grupo hidroxil livre na posição C-6, não é essencial para um efeito tipo-ansiolítico, no entanto pode tornar o composto mais ativo. Observou-se também que um grupo hidroxil na posição C-7 não é impeditivo nem essencial para um efeito tipo-ansiolítico, e é possível que um substituinte na posição C3' e/ou C4', seja importante para este efeito, embora não essencial, como observado para a QC (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona), que difere da GL (3,5,7-trihidroxi-flavona) pela presença de substituintes em C-3' e em C-4'.

Apesar de termos observado o potencial farmacológico da BC e dos flavonoides a ela relacionados como ferramentas promissoras no tratamento dos transtornos da ansiedade, mais estudos são necessários para se elucidar seu papel e dos flavonoides na modulação destes transtornos e em outras patologias do SNC, a fim de que um dia possam ser utilizados terapêuticamente com segurança.

## 6 CONCLUSÕES

- O flavonoide baicaleína (BC), injetado centralmente, promove um efeito tipo-ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado e no teste da placa perfurada;
- A BC é capaz de potencializar o sono induzido por éter etílico, indicando uma possível atividade hipno-sedativa, sem, contudo, apresentar efeito sedativo *per se*;
- A BC não promove efeito tipo-antidepressivo ou efeito anticonvulsivante nas concentrações, via e tempo testados;
- A via de administração usada, intracerebroventricular, e o tempo de observação, 5 min após o tratamento, garantem que os efeitos da BC são produto de sua ação direta central, uma vez que independem de qualquer interferência metabólica sistêmica como, por exemplo, sua transformação à baicalina, seu glicosídeo que possui atividades centrais semelhantes;
- Os efeitos centrais da BC são parcialmente dependentes da atuação no sítio GABAérgico-benzodiazepínico sensível ao flumazenil, mas seu efeito tipo-ansiolítico parece depender da atividade nos receptores GABAérgicos do tipo A, sendo modulados pelos sítios do pentilenotetrazol e de neuroesteroides, localizados próximos ao sítio da picrotoxina;
- O sistema serotoninérgico não está envolvido no efeito tipo-ansiolítico da BC, mas parece estar envolvido no seu efeito motor;
- Estudando outros flavonoides relacionados estruturalmente à baicaleína, identificamos e caracterizamos uma relação estrutura-atividade (SAR) para as flavonas e flavonóis, *in vivo*, utilizando o teste do LCE. Os flavonoides 7,8-DH (7,8-dihidroxi-flavona), 5,7-DH (5,7-dihidroxi-flavona), 7-H (7-hidroxi-flavona), 6-M (6-metoxi-flavona), AP (4',5,7-trihidroxi-flavona), 6,7-DH (6,7-dihidroxi-flavona), 6-H (6-hidroxi-flavona), QC (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) e LT (3',4',5,7-tetrahidroxi-flavona), apresentaram efeito tipo-ansiolítico, enquanto a GL (3,5,7-trihidroxi-flavona) se mostrou desprovida desse efeito nas doses e via testadas;
- Os resultados da SAR não puderam ser completamente explicados apenas pela interação dos flavonoides com o sítio benzodiazepínico, embora existam algumas características *in vitro*, confirmadas por nossos experimentos *in vivo*, que influenciam a afinidade ao receptor BDZ, como a presença de um substituinte menos polar na posição C-

6, um substituinte nas posições C-3', e a ausência de substituintes em C-3, que podem melhorar as interações estéricas entre o receptor e seus ligantes;

- Apesar de ensaios *in vitro* sugerirem que a presença de substituintes em C-7 ou C-4' não seja favorável para uma interação com o sítio BDZ, nossos resultados sugerem que um grupo hidroxil na posição C-7 não é impeditivo nem essencial para o efeito tipo-ansiolítico, e que um substituinte na posição C4', é importante para este efeito, embora não essencial;
- Além disso, substituintes no núcleo fundamental flavonoide em C-5, C-6 e C-7 do anel A e em C-3' e/ou C-4' do anel B parecem contribuir para o efeito tipo-ansiolítico no teste do LCE;
- Os resultados corroboram outros trabalhos acerca dos efeitos centrais produzidos pela flavona BC e flavonoides a ela relacionados, mostrando o potencial farmacológico terapêutico desses flavonoides para o tratamento de distúrbios da ansiedade. E, pela primeira vez, foi descrito o efeito do tipo ansiolítico para a 6-metoxiflavona, 7-hidroxiflavona, 6,7-dihidroxiflavona e 7,8-dihidroxiflavona .

## REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, S. L.; KLOOTS, W. J.; VAN AMELSVOORT, J. M. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. **Nutrition Res.**, v. 25, p. 305-317, 2005.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, food content and metabolism. **Nutrition**, v.18, p.75-81, 2002.

AI, J.; DEKERMENDJIAN, K.; WANG, X; NIELSEN, M; WITT, M. R. 6- methylflavone, a benzodiazepine receptor ligand with antagonistic properties on rat brain and human recombinant GABAARs *in vitro*. **Drug Dev. Res.**, v.41, p.99-106, 1997.

AKAO, T.; KAWABATA, K.; YANAGISAWA, E.; ISHIHARA, K.; MIZUHARA, Y.; WALUI, Y.; SAKASHITA, Y.; KOBASHI, K. Baicalin, the predominant flavone glucuronide of *Scutellariae radix*, is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.52, n.12, p.1563-568, 2000.

ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K.; KAUR, I. Antidepressant activity of quercetin, a bioflavonoid, in streptozotocin-induced diabetic mice. **J. Med. Food.**, v.6, n.4, p.391-395, 2003.

ARCHER, J. Sex differences in the emotional behaviour of laboratory mice. **Br. J. Psychol.**, v.68, p.125-131, 1977.

AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUIA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **L. Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p.1387-94, 2000.

AVILA, M. A.; VELASCO, J. A.; CANSADO, J.; NOTARIO, V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. **Cancer Res.**, v.54, p.2424-28, 1994.

BELELLI, D.; LAMBERT, J. J. Neurosteroids: Endogenous regulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.6, p.565-575, 2005.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, n.15, p.6185-205, 2008.

BITRAN, D.; DOWD, J. A. Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. **Psychopharmacology**, v.125, p.65-75, 1996.

BOCHORAKOVA, H.; PAULOVA, H.; SLANINA, J.; MUSIL, P.; TABORSKA, E. Main flavonoids in the root of *Scutellaria baicalensis* cultivated in Europe and their comparative antiradical properties. **Phytother. Res.**, v.17, n.6, p.640-644, 2003.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. La reaction d'exploration chez la souris. *Therapie*, v.17, p.1225-232, 1962. Apud TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.350, p.21-29, 1998.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. Dissociation de deux composantes dans le compartiment d'investigation de la souris. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, v.147, p.372-387, 1964. Apud TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.350, p.21-29, 1998.

BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D. J. P. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension test. **Behav. Brain Res.**, v.164, p.266-269, 2005.

BROT, M. D.; AKWA, Y.; PURDY, R. H.; KOOB, G. F.; BRITTON, K. T. The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.325, p.1-7, 1997.

BROWN, E.; HURD, N. S.; MCCALL, S.; CEREMUGA, T. E. Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, in the laboratory rat. **AANJ**, v.75, n.5, p.333-337, 2007.



- CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.75, 501-512, 2003.
- CARLINI, E. A.; BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e clorobenzapam. **Rev. Ass. Bras. Psiquiatr.** São Paulo, v.1, p.25-31, 1979.
- CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; DA SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) I. Effects of teas prepared from the leaves on the laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, v.17, p.37-64, 1986.
- CHAMBERS, D. M.; JEFFERSON, G. C.; RUDDICK, C. A. Halothane-induced sleeping time in the mouse: its modification by benzodiazepines. **Eur. J. Pharmacol.**, v.50, n.2, p.103-112, 1978.
- CHANG, W. S.; LEE, Y. J.; LU, F. J.; CHIANG, H. C. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine. **Anticancer Res.**, v.13, n.6A, p.2165-170, 1993.
- CHEN, C.-J.; RAUNG, S.-L.; LIAO, S.-L. CHEN, S.-Y. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by baicalein in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. **Biochem. Pharmacol.**, v.67, p.957-965, 2004.
- CHEN, J.-C.; HO, F.-M.; CHAO, P.-D.L.; CHEN, C.-P.; JENG, K.-C.G.; HSU, H.-B.; LEE, S.-T.; WU, W. T.; LIN, W.-W. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I $\kappa$ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. **Eur. J. Pharmacol.**, v.521, p.9-20, 2005.
- CHEN, L. J.; GAMES, D. E.; JONES, J. Isolation and identification of four flavonoids constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography. **J. Chromatogr.**, v.988, n.1, p.95-105, 2003.
- CHENG, Y.; HE, G.; MU, X.; ZHANG, T.; LI, X.; HU, J.; XU, B.; DU, G. Neuroprotective effect of baicalein against MPTP neurotoxicity:

Behavioral, biochemical and immunohistochemical profile. **Neurosci. Lett.**, v.441, p.16-20, 2008.

CHENG, Y-C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, v.22, p.3099-3108, 1973. Apud CHENG, H.C. The power issue: determination of  $K_B$  or  $K_i$  from  $IC_{50}$ . A closer look at the Cheng-Prusoff equation, the Schild plot and related power equations. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.46, p.61-71, 2002.

CHOI, S. Y.; HA, T. Y.; AHN, J.Y.; KIM, S.R.; KANG, K.S.; HWANG, I. K.; KIM, S. Estrogenic activities of isoflavones and flavones end their structure-activity relationships. **Planta Med.**, v.74, p.25-32, 2008.

CHWEH, A. Y.; SWINYARD, E. A.; WOLF, H. H. Hypnotic action of pentobarbital in mice: a possible mechanism. **Exp. Neurol.**, v.97, p.70-76, 1987.

COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM M. D.; LIMA, T. C. M. , et al. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effect of *Passiflora edulis* Sims., its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytother. Res.**, v.20, p.1067-73, 2006.

COLETA, M.; CAMPOS, M. G.; COTRIM, M. D.; DE LIMA, T. C. M.; DA CUNHA, A. P. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. **Behav. Brain Res.**, v.189, p.75-82, 2008.

COLLINS, B. M.; MCLACHLAN, J. A.; ARNOLD, S. F. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. **Steroids**, v. 62, p.365-372, 1997.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.49, n.1, p. 171-176, 1994.

CZUCZWAR, S. J.; FREY, H. H. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. **Neuropharmacology**, v.25, n.5, p.465-469, 1986.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: Flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 62, n. 4, p.727-734, 1999.

DE FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Brasília-DF. Ministério da Saúde, Secretaria Executiva, Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento, Núcleo Nacional de Economia da Saúde, Outubro/2007.

DEKERMENDJIAN, K.; KAHNBERG, P.; WITT, M.-R.; STERNER, O.; NIELSEN, M.; LILJEFORS, T. Structure-Activity Relationships and Molecular Modeling Analysis of Flavonoids Binding to the Benzodiazepine Site of the Rat Brain GABA<sub>A</sub> Receptor Complex. **J. Med. Chem.**, v.42, p.4343-50, 1999.

DEYN, P.P.; D'HOOGE, R.; MARESCAU, B.; PEI, Y.Q. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. **Epilepsy Res.**, v.12, p.87-110, 1992.

DIMPFEL, W. Rat electropharmacograms of the flavonoids rutin and quercetin in comparison to those of moclobemide and clinically used reference drugs suggest antidepressive and/or neuroprotective action. **Phytomedicine**, v.16, p.287-294, 2009.

DINIZ, A.; ESCUDER-GILABERT, L.; LOPES, N. P.; GOBBO-NETO, L.; VILLANUEVA-CAMANÃS, R. M.; SAGRADO, S.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M. J. Permeability profile estimation of flavonoids and other phenolic compounds by biopartitioning micellar capillary chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v.55; p.8372-79, 2007.

DORONICHEVA, N.; YASUI, H., SAKURAI, H. Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, n.2, p.213-217, 2007.

DUARTE, F. S.; DUZZIONI, M.; MENDES, B. G.; PIZZOLATTI, M. G.; DE LIMA, T. C. M. Participation of dihydrostyryl-2-pyrones and styryl-2-pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.86, p.150-161, 2007.

DUARTE, F. S.; MARDER, M.; HOELLER, A. A.; DUZZIONI, M.; MENDES, B. G.; PIZZOLATTI, M. G.; DE LIMA, T. C. M. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: *in vitro* and *in vivo* interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology**, v.197, p.351-360, 2008.

FILE, E. S.; PELLOW, S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **Br. J. Pharmac.**, v.86, p.729-735, 1985.

FERNÁNDEZ, S.P.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A.C. ; MARDER, M. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. **Eur. J. Pharmacol.**, v.512, p.189-198, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, v.341, p.1103-1104, 1993. Apud HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.12, p.306-317, 2008.

GERRITSEN, M. E.; CARLEY, W. W.; RANGES, G. E.; SHEN, C. P.; PHAN, S. A.; LIGON, G. F.; PERRY, C. A. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. **Am. J. Pathol.**, v.147, p.278-292, 1995.

- GIBBS, T. T.; RUSSEK, S. J.; FARB, D. H. Sulfated steroids as endogenous neuromodulators. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.84, p.555-567, 2006.
- GOMES, N. G. M.; CAMPOS, M. G.; ÓRFÃO, J. M. C.; RIBEIRO, C. A. F. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 33, p. 1372-89, 2009.
- GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v.163, p.467-476, 2002.
- GOUTMAN, J. D.; WAXEMBERG, M. D.; DOÑATE-OLIVER, F.; POMATA, P. E.; CALVO, D. J. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.461, p.79-87, 2003.
- HOAR, W. S.; HICKMAN, C. P. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: **General and comparative physiology**. 2.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1975. cap.39, p.260-267.
- HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food Chem. Toxicol.**, v.37, p.937-942, 1999.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.
- HEO, H.J.; KIM, D.O.; CHOI, S.J.; SHIN, D.H.; LEE, C.Y. Potent inhibitory effect of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* on amyloid beta protein-induced neurotoxicity. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.13, p.4128-32, 2004.
- HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, p.2379-83, 1992.
- HAN, X. H.; HONG, S. S.; HWANG, J. S.; LEE, M. K.; HWANG, B. Y.; RO, J. S. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. **Arch. Pharm. Research.**, v.30, n.1, p.13-17, 2007.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration of “fear”-motivated behaviour. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, v.327, p.1 -5, 1984.

HIRANI, K.; SHARMA, A. N.; JAIN, N. S.; UGALE, R. R.; CHOPDE, C. T. Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats. **Psychopharmacology**, v.180, p.267-278, 2005.

HOLLMAN, P. C. H.; VAN TRIJP, J. M. P.; MENGELERS, M. J. B.; VRIES, J. H. M.; KATAN, M. M. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. **Cancer Lett.**, v.114, p.139-140, 1997.

HUANG, R.-Q.; BELL-HORNER, C. L.; DIBAS, M. I.; COVEY, D. F.; DREWE, J. A.; DILLON, G. H. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptors: Mechanism and site of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.298, n.3, p.986-995, 2001.

HUANG, Y.; TSANG, S.Y.; YAO, X.; CHEN, Z.Y. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. **Curr. Drug. Targets Cardiovasc. Disord.**, v.5, n.2, p.177-184, 2005.

ILHAN, A.; IRAZ, M.; GUREL, A.; ARMUTCU, F.; AKYOL, O. Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylentetrazolinduced seizures in mice. **Neurochem. Res.**, v.29, n.12, p.2287-2292, 2004.

IGUAL, M. M. Farmacología clínica del sistema GABAérgico (I). **Méd. Clin. (Barc)**, v.102, p.339-345, 1994.

ILAVARASAN, R.; MALLIKA, M.; VENKATARAMAN, S. Anti-inflammatory and free radical scavenging activity of *Ricinus communis* root extract. **J. Ethnopharmacol.**, v.103, p.478-480, 2006.

JACOBSON, K.A. Adenosine A<sub>3</sub> receptors: novel ligand and paradoxical effects. **TIPS**, v.19, p.183-190, 1998.

JAIN, N. S.; HIRANI, K.; CHOPDE, C. T. Reversal of caffeine-induced anxiety by neurosteroid 3-alpha-hydroxy-5-alpha-pregnane-20-one in rats. **Neuropharmacology**, v.48, p.627-638, 2005.

JANG, S-W.; LIU, X.; YEPES, M.; SHEPHERD, K. R.; MILLER, G.W.; LIU, Y.; WILSON, D.; XIAO, G.; BLANCHI, B.; SUN, Y.E.; YE, K. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. **Pros. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.107, n.6, p. 2687-92, 2010.

JARRY, H.; SPENGLER, B.; PORZEL, A.; SCHIMIDT, J.; WUTTKE, W.; CHRISTOFFEL, V. Evidence for estrogen receptor beta-selective activity of *Vitex agnus-castus* and isolated flavones. **Planta Med.**, v.69, n.10, p.945-947, 2003.

LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J. Pharmacol. Meth.**, v.16, n.4, p.355-357, 1986.

TREVOR, A. J.; MILLER, R. D. Anestésicos gerais. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 6.ed. Sup. de Tradução: Penildon Silva. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 24, p.291-300. Tradução de: Basic & Clinical Pharmacology.

KAVVADIAS, D.; SAND, P.; YODIM, K. A.; KAISER, M. Z.; RICE-EVANS, C.; BAUR, R.; et al. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. **B. J. Pharmacol.**, v.142, p.811-820, 2004.

KIM, J. Y.; LEE, S.; KIM, D. H.; KIM, B. R.; PARK, R.; LEE, B. M. Effects of flavonoids isolated from *Scutellariae radix* on cytochrome P-450 activities in human liver microsomes. **J.Toxicol. Environ. Health. A.**, v.65, n.5-6, p.373-381, 2002.

KIMURA, Y.; MATSUSHITA, N.; OKUDA, H. Effects of baicalin isolated from *Scutellaria baicalensis* on interleukin 1 beta- and tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. **J. Ethnopharmacol.**, v.57, n.1, p.63-67, 1997.

KITAGAWA, S. Inhibitory effects of polyphenols on p-glycoprotein-mediated transport. **Biol. Pharm. Bull.**, v.29, n.1, p.1-6, 2006.

KORBI, E. R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. **Prog. Neurobiol.**, v.67, p.113-159, 2002.

KUMAR, A.; GOYAL, R. Quercetin protects against acute immobilization stress-induced behaviors and biochemical alterations in mice. **J Med Food**, v.11, n.3, p.469-473, 2008.

KYO, R.; NAKAHATA, N.; SAKAKIBARA, I.; KUBO, M.; OHIZUMI, Y. Baicalin and baicalein, constituents of an important medicinal plant, inhibit intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation by reducing phospholipase C activity in C6 rat glioma cells. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.50, n.10, p.1179-82, 1998.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; DE LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre: Metrópole, 2003.

LEE, M-H.; LIN, R-D; SHEN, L-Y; YANG, L-L; YEN, K-Y; HOU, W-C. Monoamine oxidase B and free radical scavenging activities of natural flavonoids in *Melastoma candidum* D. Don. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.5551-55, 2001.

LIAO, J. F.; HUNG, W. Y.; CHEN, C. F. Anxiolytic-like effects of baicalein and baicalin in the Vogel conflict test in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.464, p.141-146, 2003.

LIAO, J. F.; WANG, H. H.; CHEN, M. C.; CHEN, C. C.; CHEN, C. F. Benzodiazepine binding site-interactive flavones from *Scutellaria baicalensis* root. **Planta Med.**, v.64, n.6, p.571-572, 1998.

LIN, C. M.; CHEN, C. S.; CHEN, C. T.; LIANG, Y. C.; LIN, J. K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.294, n.1, p.167-72, 2002.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**; v.92, p.180-185, 1987.



LOSCALZO, L. M.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A. C.; MARDER, M. Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. **Eur. J. Pharmacol.**, v.580, p.306-313, 2008.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.**, v.2, p.145 - 181, 1988.

LOPES, D. V. S.; CARUSO, R. R. B.; CASTRO, N. G.; COSTA, P. R. R.; DA SILVA, A. J. M.; NOËL, F. Characterization of a new synthetic isoflavonoid with inverse agonist activity at the central benzodiazepine receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v.495, p.87-96, 2004.

LOSI, G.; PUIA, G.; GARZON, G.; DE VUONO, M.C.; BARALDI, M. Apigenin modulates GABAergic and glutamatergic transmission in cultured cortical neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, v.502, p.41-46, 2004.

MACDONALD, R. L.; OLSEN, R. W. GABA<sub>A</sub> receptor channels. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.17, p.569-602, 1994.

MANACH, C; MORAND, C.; TEXIER, O.; FAVIER, M. L.; AGULLO, G.; DEMIGNE, C.; REGERAT, F.; RÉMÉSY, C. Quercetin metabolites in plasma of rat diets containing rutin or quercetin. **J. Nutr.**, v.125, n.7, p.1911-22, 1995.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; FERNÁNDEZ, S.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.75, p.737-745, 2003.

MARDER, M.; ESTIÚ, G.; BLANCH, B.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J. H., et al. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA<sub>A</sub> receptor complex. **Bioorg. Med. Chem.**, v.9, p.323-335, 2001.

MARDER, M.; PALADINI, A. C. GABA<sub>A</sub> - receptor ligands of flavonoid structure. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.2, p.847-861, 2002.

MARQUES DE CARVALHO, Rebeca Santos. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbascosídeo de *Lippia alba* (MILLER) N. E. Brown (falsa melissa) – Verbenaceae.** 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2006.

MARTINI, L. H.; SOUZA, C. R. S.; MARQUES P. B.; CALIXTO, J. B.; YUNES, A. R.; SOUZA, D. O. Compounds extracted from *Phyllanthus* and *Jatropha elliptica* inhibit the binding of [3H]glutamate and [3H]GMP-PNP in rat cerebral cortex membrane. **Neurochem. Res.**, v.25, n.2, p. 211-215, 2000.

MELCHIOR, C. L.; RITZMANN, R. F. Dehydroepiandrosterona is an anxiolytic in mice on the plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.47, n.3, p.437-441, 1994.

MELLO, L. E. A.; BOTOLOTZO, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Modelos experimentais de epilepsia: Uma revisão. **Neurobiologia**, v.49, p.231-268, 1986.

MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C.; WOLFMAN, C.; LEVI DE STEIN, M.; CALVO, D.; DIAZ, L.; et al. Abstract. Chrysin (5-7 di OH flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors with anticonvulsant properties. **Biochem. Pharmacol.**, v.40, p.2227-32, 1990.

MONNET, F. P.; MAHÉ, V.; ROBEL, P.; BAULIEU, E. E. Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [<sup>3</sup>H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.3774-78, 1995.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v.48, n.4, p.254-260, 1955.

MÖHLER, H. GABA<sub>A</sub> receptor diversity and pharmacology. **Cell Tissue Res.**, v.326, p.505-516, 2006.

MÖHLER, H.; FRITSCHY, J.M.; CRESTANI, F.; HENSCH, T.; RUDOLPH, U. Specific GABA<sub>A</sub> circuits in brain development and therapy. **Biochem. Pharmacol.**, v.68, p.1685-90, 2004.

MÖHLER, H.; RICHARDS, J. G.; Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interaction *in vitro*. **Nature**, v.294, p.763-765, 1981.

MORA, A.; PAYA, M.; RIOS, J.L.; ALCARAZ, M.J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymatic lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v.40, p.793-797, 1990.

MU, X.; He, G.; CHENG, Y.; LI, X.; Xu B.; Du G. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6- hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism *in vivo* and *in vitro*. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.92, p.642-648, 2009.

NAKAZAWA, T.; YASUDA, T.; UEDA, J.; OHSAWA, K. Antidepressant-like effects of apigenin and 2,4,5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla frutescens* in the Forced Swimming Test. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, n.4, p.474-480, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v.70, p.461-477, 2007.

OHNO, S.; MATSUMOTO, H.; WATANABE, M.; NAKAJIN, S. Flavonoid inhibition of overexpressed human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.88, p.175-182, 2004.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v.25, p.219-233, 2001.L

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, v.14, p.149-167, 1985.

PESCE, M. E; ACEVEDO, X.; BUSTAMANTE, D.; MIRANDA, H. E.; PINARDI, G. Progesterone and testosterone modulate the convulsant

actions of pentylenetetrazol and strychnine in mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v.87, n.3, p.116-119, 2000.

PRISINZANO, T. E. Natural products as tools for neuroscience: discovery and development of novel agents to treat drug abuse. **J. Nat. Prod.**, v.72, p.581-587, 2009.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests. **Trends in Pharmacol. Sci.**, v.29, n.10, p.493-498, 2008.

REDDY, D. S.; KULKARNI, S. K. Differential anxiolytic effects of neurosteroids in the mirrored chamber behavior test in mice. **Brain Res.**, v.752, p.61-71, 1997.

REN, L.; WANG, F.; XU, Z.; CHAN, W. M.; ZHAO, C.; XUE, H. GABA<sub>A</sub> receptor subtype selectivity underlying anxiolytic effect of 6-hydroxyflavone. **Biochem. Pharmacol.**, v.79, n.9, p.1337-44, 2010.

PHILLIPS, D. S. Choosing a statistic. In: PHILLIPS, D. S. **Basic Statistics for Health Science Students**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1978. cap. 15, p.128-129.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.21, n.6, p.801-810, 1997.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A.; editors. **Ethology and Psychopharmacology**. Chichester: Wiley, 1994. p.9-44.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.30, p.289-304, 1997.

SALGUEIRO, J. B.; ARDENGHI, P.; DIAS, M.; FERREIRA, M. B.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in Rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.58, n.4, p.887-891, 1997.

- SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C.  
Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomed. Pharmacother.**, v.56, p.276-282, 2002.
- SENA, L. M.; ZUCOLOTTI, S. M.; REGINATT, F. H.; SCHENKEL, E.P.; DE LIMA, T. C. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* flavicarpa degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Exp. Biol. Med.**, v.234, n.8, p.967-975, 2009.
- SETEM, J.; PINHEIRO, A. P.; MOTTA, V. A.; MORATO, S.; CRUZ, A. P. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.62, n.3, p.515-521, 1999.
- SHIA, C-S.; TSAI, S-Y.; KUO, S-C; HOU, Y-C.; CHAO, P-D L.  
Metabolism and Pharmacokinetics of 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone (Fisetin), 5-Hydroxyflavone, and 7-Hydroxyflavone and Antihemolysis effects of fisetin and its serum metabolites. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p. 83-89, 2009.
- SIEGHART, W.; SPERK, G. Subunit composition, distribution and function of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. **Curr. Top. Méd. Chem.**, v.2, p.795-816; 2002.
- SIMON, J.; WAKIMOTO, H.; FUJITA, N; LALANDE, M; BARNARD, E. A. Analysis of the set of GABA<sub>A</sub> receptor genes in the human genome. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.41422-35, 2004.
- SKILBECK, K. J.; HINTON, T.; JOHNSTON, G. A. R. Sex-differences and stress: Effects on regional high and low affinity [<sup>3</sup>H]GABA binding. **Neurochem. Int.**, v.52, p.1212-1219, 2008.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p.367-370, 1985.
- SÖDERPALM, B.; SVENSSON, L.; HULTHE, P.; JOHANNESSEN, K.; ENGEL, J. A. Evidence for a role for dopamine in the diazepam locomotor stimulating effect. **Psychopharmacology**, v.104, n.1, p.97-102, 1991.

SOUZA, A.; TICKU, M. K. Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA(A) receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.282, p.827-833, 1997.

SPENCER, J. P. E.; KUHNLE, G. G. C.; WILLIAMS, R. J.; RICE-EVANS, C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. **Biochem. J.**, v.372, p.173-181, 2003.

SWINYARD, E. A.; BROWN, W. C.; GOODMAN, L.S. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.106, p.319-330, 1952.

SWINYARD, E. A.; WOODHEAD, H.; WHITE, S.; FRANKLIN, M.R. Experimental selection, quantification and evaluation of anticonvulsants. In: LEVY, R.; MATTSON, R.; MELDRUM, B.; PENRY, J. K.; DREIFUSS, F. E. (eds); **Antiepileptic Drugs**, 3<sup>a</sup> edition. Raven Press, New York, 1989.

TARRAGÓ, T.; KICHIK, N.; CLAASEN, B.; PRADES, R.; TEIXIDÓ, M.; GIRALT, E. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolololigopeptidase inhibitor. **Bioorg Med. Chem.**, v.16, p.7516-24, 2008.

TANZI, R. E.; BERTRAM, T. Review Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. **Cell**, v.120, p.545-555, 2005.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.350, p.21-29, 1998.

TAYLOR, C.; FRICKER, A. D.; DEVI, L. A.; GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell. Signal.**, v.17, 549-557, 2005.

TENEN, S. S. The Effects of p-Chlorophenylalanine, a Serotonin Depletor, on Avoidance Acquisition, Pain Sensitivity and Related Behavior in the Rat. **Psychopharmacologia**, v.10, p.204-219, 1967.

TEIXEIRA, Raquel Maria. **Participação do receptor taquicinérgico NK1 na modulação dos efeitos comportamentais e na distribuição de leucócitos produzidos por estresse**. 2003. 246 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2003.

TOURNAIRE, C.; CROUX, S.; MAURETTE, M. T.; BECK, I.; HOCQUAUX, M.; BRAUN, M. A.; OLIVEROS, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) quenching. **J. Photochem. Photobiol. Biol.**, v.19, n.3, p.205-15, 1993.

VIEIRA, Ricardo Alessandro. **Avaliação dos efeitos centrais do extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* Vahl**. 2001. 121 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2001.

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; LEVI DE STEIN, M.; WOLFMAN, C.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. **Planta Med.**, v.61, n.3, p.213-216, 1995.

VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; LEVI DE STEIN, M.; WASOWSKI, C.; PEÑA, C.; MEDINA, J. M.; PALADINI, A. C. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v.44, p.47-53, 1994.

WALLE, T. Serial review: Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, v.36, n.7, p.829-837, 2004.

WANG, F.; SHING, M.; HUEN, Y.; TSANG, S. Y.; XUE, H. Neuroactive flavonoids interacting with GABA<sub>A</sub> receptor complex. **Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.**, v.4, n.5, p.575-585, 2005.

WANG, F.; ZHIWEN, X.; REN, L.; TSANG, S. Y.; XUE, H. GABA<sub>A</sub> receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin. **Neuropharmacology**, v.55, p.1231-37, 2008.

WANG, H.; HUI, K. M.; CHEN, Y.; XU, S.; WONG, J. T.; XUE, H. Structure-activity relationships of flavonoids, isolated from *Scutellaria baicalensis*, binding to benzodiazepine site of GABA(A) receptor complex. **Planta Med.**, v.68, n.12, p.1059-62, 2002.

WANG, S.-Y.; WANG, H.-H.; CHI, C.-W.; CHIEH, C.-F.; LIAO, J.F. Effects of baicalein on  $\beta$ -amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.506, p.55-61, 2004.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.47, n.1, p.1-4, 1994.

YODIM, K. A.; KAISER, M. Z.; BEGLEY, D. J.; RICE-EVANS, C. A.; ABBOTT, N. J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier. **Free Radic. Biol. Med.**, v.36, p.592-604, 2004.

YI, L.-T.; LI, J.-M.; LI, Y.-C.; PAN, Y.; XU, Q.; KONG, L.-D. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. **Life Sci.**, v.82, p.741-751, 2008.

YU, H.-S.; LEE, S.-Y.; JANG, C.-G. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors in the anxiolytic-like effects of *Cinnamomum cassia* in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.87, p.164-170, 2007.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v.71, p.117-123, 2000.

ZERN, T. L.; FERNANDEZ, M. L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. **J. Nutr.**, v.135, p.2291-94, 2005.

ZÉTOLA, M.; DE LIMA T. C. M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R. P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V.L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* — *Verbenaceae* (Brazilian false melissa). **J. Ethnopharmacol.**, v.82, p.207-215, 2002.



ZHANG, L.; LIN, G.; KOVÁCS, B.; JANI, M.; KRAJCSI, P.; ZUO, Z.;. Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.31, p.221-231, 2007.

ZHANG, R.; KANG, K. A.; PIAO, M. J.; KO, D. O.; WANG, Z. H.; CHANG, W. Y.; YOU, H. J.; LEE, I. K.; KIM, B. J. ; KANG, S. S.; HYUN, J. W. Preventive Effect of 7,8-Dihydroxyflavone against Oxidative Stress Induced Genotoxicity. **Biol. Pharm. Bull.**, v.32, p.2-166-171, 2009.

ZHANG, W.; KOEHLER, K. F.; ZHANG, P.; COOK, J. M. Development of a comprehensive pharmacophore model for the benzodiazepine receptor. **Drug Des. Dev.**, v.12, p.193-248, 1995.

ZHU, J. T. T.; CHOI, R. C. Y.; CHU, G. K. Y.; CHEUNG, A. W. H.; GAO, Q. T.; LI, J.; JIANG, Z. Y.; DONG, T. T. X.; TSIM, K. W. K. Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells: A comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing  $\beta$ -amyloid-induced cell death. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p.2438-45, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J.A. **Flavonoides**. In: SIMÕES, C.M.O...[et al.] (organizadores). Farmacognosia da planta ao medicamento. 5.ed. ver. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003.

## **APÊNDICES**

**QUADRO A- PRINCIPAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE RELEVÂNCIA PARA O SNC  
ENCONTRADAS PARA A BAICALEÍNA E FLAVONOIDES RELACIONADOS**

<b>Flavonoide</b>	<b>Atividade Farmacológica</b>	<b>Doses/Concentrações usadas e ensaios</b>	<b>Referência</b>
<b>Baicaleína (BC)</b>	-neureoproteção na doença de Parkinson experimental	-200 mg/kg v.o., por 20 dias, em ratos - 0,5 e 5 µg/mL, <i>in vitro</i>	Mu et al., 2009
<b>BC</b>	-neureoproteção contra MPTP -aumenta níveis de dopamina e serotonina	-200 mg/kg v.o., por 10 dias em camundongos -ambulação espontânea, “pole test” e histoquímica	Cheng et al., 2008
<b>BC</b>	-inibe a lipoxigenase	- 0,5 µmol/L, <i>in vitro</i>	Alonso-Galicia et al., 2007
<b>BC</b>	-fraca estrogênica -não antioxidante -bom anti-β-amiloide	- 0,1 - 50 µM, <i>in vitro</i> -ensaios com cel. MCF 7; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzida por ROS; cultura de células PC 12	Zhu et al., 2007
<b>BC</b>	-inibe a lipoxigenase	-12-hLO: CI <sub>50</sub> =0,63 µM -15-hLO-1: CI <sub>50</sub> =38 µM, <i>in vitro</i>	Deschamps et al., 2006
<b>BC</b>	-inibe a glicoproteína-P	-50-200 µM <i>in vitro</i> -ensaios com células KB-C2	Kitagawa et al., 2005
<b>BC</b>	-inibe a expressão da iNOS em macrófagos e micróglia	-ensaios em macrófagos e células da micróglia murinas; “imunoblot” -1, 5, 10, 20*, 25* µM - CI <sub>50</sub> =6.3±1,4 µM; CI <sub>50</sub> =19.6±1,1 µM	Chen et al., 2004
<b>BC</b>	- impede a vasodilatação induzida por Acetilcolina e	-50 µM, <i>in vitro</i> , anéis de aorta isolada de rato	Huang et al, 2004

	mediado pelo NO		
<b>BC</b>	-atenua amnésia induzida por peptídeo $\beta$ -amiloide -sem efeito amnésico	-10-15 mg/kg, i.p./dia/2-14 dias -10-100 mg/kg.i.p., em camundongos, “step-through passive avoidance test”	Wang et al., 2004
<b>BC</b>	-ansiolítica, antagonizado pelo flumazenil 2 mg/kg	-20 mg/kg, i.p., 30 min. antes, em camundongos no teste do conflito de Vogel	Liao et al., 2003
<b>BC</b>	-interage com o sistema microsomal hepático -atividade inibidora do citocromo P-450 CYP3A4 e CYP1A2	-microssomas de fígado humano -concentração inibitória de 17,4 microM	Kim et al., 2002
<b>BC</b>	-inibe a expressão de iNOS e produção de NO induzida por lipopolissacarídeo (LPS) -não interferem com a atividade da iNOS, produção de PGE <sub>2</sub> e expressão da COX-2	- 5, 10, 20, 40 $\mu$ M, <i>in vitro</i> , na produção de NO e PGE <sub>2</sub> induzida por LPS; -expressão de iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264,7, induzida por LPS e “western blot”	Chen et al., 2001
<b>BC</b>	-não inibe a aromatase	-50 $\mu$ M <i>in vitro</i> e computacional	Kao et al., 1998
<b>BC</b>	-inibe o aumento da concentração de cálcio e de inositol fosfato induzido pela histamina, via redução da atividade de fosfolipase C	- <i>in vitro</i> em células C6 de glioma de rato	Kyo et al., 1998
<b>BC</b>	-interação com GABA <sub>A</sub>	-K <sub>i</sub> =13,1 $\mu$ mol/L, <i>in vitro</i>	Liao et al., 1998

<b>BC</b>	-inibe potentemente a atividade da xantina oxidase	- $CI_{50} = 9,44 \mu M$ , <i>in vitro</i>	Chang et al., 1993
<b>Apigenina (AP)</b>	-moderada estrogênica em receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$	- $10^{-4}$ - $10^{-6}$ M <i>in vitro</i>	Choi et al., 2008
<b>AP</b>	-↓ tempo de imobilidade no nado -reverte a ↓ da ingestão de sacarose induzida pelo estresse crônico -atenua as alterações induzidas pelo estresse nos níveis de dopamina e serotonina em diferentes regiões cerebrais de ratos, -reverte o ↑ dos níveis de corticosterona induzidos pelo estresse crônico	-10 e 20 mg/kg, v.o./24 h, 1-2 sem. camundongos -7 e 14 mg/kg v.o. / 24 h / 4 semanas, ratos -teste do nado forçado em camundongos; estresse “brando” crônico em ratos e dosagens bioquímicas	Yi et al., 2008
<b>AP</b>	-interage com transportadores celulares	- 50 $\mu M$ , <i>in vitro</i>	Wang et al., 2007
<b>AP</b>	-moderada estrogênica -fraca antioxidante -não anti- $\beta$ -amiloide	- 0,1 - 50 $\mu M$ , <i>in vitro</i> -ensaios com cel. MCF 7; $H_2O_2$ induzida por ROS e cultura de células PC 12	Zhu et al., 2007
<b>AP</b>	-inibe as correntes induzidas por NMDA e GABA	- $CI_{50} = 10 \mu M$ e $CI_{50} = 17 \mu M$ , <i>in vitro</i> -“patch-clamp”	Losi et al., 2004
<b>AP</b>	-fraco inibidor da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide	- <i>in vitro</i> , $CI_{50}=1,26 \times 10^{-4}$ M	Ohno et al., 2004

	desidrogenase II		
<b>AP</b>	-inibe as correntes iônicas mediadas por receptores $\alpha_1\beta_1\gamma_2\delta$ GABA <sub>A</sub> e $\rho_1$ GABA <sub>C</sub> -este efeito é insensível ao FMZ	-30 $\mu$ M	Goutman et al., 2003
<b>AP</b>	-reduz a imobilidade no nado forçado, o qual é bloqueado pelo haloperidol (antag. D <sub>2</sub> ) - atenua alteração nos níveis de dopamina na amígdala e no hipotálamo	-12,5*, 25*, 100 mg/kg, i.p., 1 hora antes, em camundongos no teste do nado forçado -teste de “turnover” de monoaminas 40 min. após o teste	Nakazawa et al., 2003
<b>AP</b>	-ligante do receptor GABA com baixa afinidade, bloqueado pelo FMZ (1 $\mu$ M) -↓ condutância de cloreto no receptor GABA -↓ lat. convulsão -↓ atividade motora, não bloqueado pelo FMZ -sem efeito ansiolítico, miorrelaxante ou anticonvulsivante	-0,1*, 1* e 10* $\mu$ M <i>in vitro</i> nos ensaios eletrofisiológicos -ensaios de <i>binding</i> : $CI_{50}=2,5 \times 10^{-4}$ M , em membranas cerebelares de rato -0,5, 12,5, 25*, 50* mg/kg, i.p. em ratos, 15 min antes do teste, teste do campo aberto, labirinto em cruz, convulsões por picrotoxina	Avallone et al., 2000
<b>AP</b>	-não ansiolítico -sedativo (não no sono barbitúrico), não antagonizado por FMZ (3 mg/kg, 15 min	-12,5, 25*, 50*, 100* mg/kg, i.p., 15 min antes, em ratos (100% DMSO) -testes do labirinto em cruz, campo aberto e sono barbitúrico	Zanoli et al., 2000

	antes)		
<b>AP</b>	-sem efeito sobre memória	-10 mg/kg i.p., 1 h antes, em ratos, no campo aberto, “step-down” e “tail-flick”	Salgueiro et al., 1997
<b>AP</b>	-interage com receptor BDZ -sem efeito sobre muscarínico e $\alpha$ -1 -tipo-ansiolítico -sem efeito sedativo, anticonvulsivante ou relaxante muscular	- <i>binding</i> ao BDZ-R, $K_i = 4 \mu\text{M}$ -3-100 mg/kg, i.p., em camundongos no labirinto em cruz, convulsões induzidas por pentilenotetrazol, placa perfurada, teste do arame, caixa de atividade	Viola et al., 1995
<b>Luteolina (LT)</b>	-tipo-ansiolítica -hipno-sedativo -tipo-antidepressivo e bloqueador da catalepsia induzida pelo haloperidol -ligante BDZ-R, com baixa afinidade	-5 mg/ kg v.o., em camundongos no teste do labirinto em cruz e da placa perfurada - 10 mg/kg v.o., no teste do sono induzido por pentobarbital -5 mg/kg v.o., por 14 dias, no teste do nado forçado -5 mg/kg v.o., no teste da catalepsia - <i>in vitro</i> , $K_i$ de <i>binding</i> = $60 \mu\text{M}$	Coleta et al., 2008
<b>LT</b>	-interage com transportadores celulares	-50 $\mu\text{M}$ , <i>in vitro</i> , no teste do transporte mediado por MCT1 (monocarboxilato) - 10 mg/kg i.v. (5% DMSO) em ratos	Wang et al., 2007
<b>Quercetina (QC)</b>	-inibe a monoamino oxidase e poder atuar como antidepressivo (sugestivo)	-5-40 mg/kg, v.o., eletrofarmacografia em ratos	Dimpfel, 2009
<b>QC</b>	-reduz a ansiedade induzida pelo estresse -neuroprotetora	-20 e 40 mg/kg, i.p., em camundongos, modelo do estresse por imobilização, câmara espelhada, “tail flick”	Kumar et al., 2008

		- <i>ex vivo</i> , dosagens bioquímicas na peroxidação lipídica	
QC	-antioxidante -neuroprotetora -inibe formação de óxido nítrico induzido por lipopolissacarídeo e interferon gama, -interage com fatores de transcrição	- 1, 3*, 10*, 30* $\mu\text{M}$ , <i>in vitro</i> , com células microgliais murinas e, testes bioquímicos	Chen et al., 2005
QC	-fraco inibidor da enzima $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase II	- $\text{CI}_{50}=8,35 \times 10^{-5} \text{ M}$ , <i>in vitro</i>	Ohno et al., 2004
QC	-antidepressiva	-50 e 100 mg/ kg, i.p., em camundongos diabéticos, no teste do nado forçado	Anjaneyulu et al., 2003
QC	-inibe as correntes iônicas mediadas por receptores $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s}$ GABA <sub>A</sub> e $\rho_1$ GABA <sub>C</sub> -este efeito é insensível ao FMZ -inibe receptores nicotínicos e serotoninérgicos e em menor grau os kaínicos de glutamato	-10 e 30 $\mu\text{M}$ , <i>in vitro</i>	Goutman et al., 2003
QC	-ação antioxidante superior aos seus metabólitos	- 0,3-10*-30 $\mu\text{M}$ , teste de danos celulares, em fibroblastos, induzidos por $\text{H}_2\text{O}_2$	Spencer et al., 2003
QC	-inibidor da MAO B -sequestrador de radical	- <i>in vitro</i> , $\text{CI}_{50}=10,89 \mu\text{M}$ , $\text{K}_i = 7,95 \mu\text{M}$ -10 $\mu\text{g/mL}$ , <i>in vitro</i>	Lee et al., 2001



	hidroxil		
<b>QC</b>	-modula atividade glutamatérgica no cérebro de ratos - ligante do receptor de glutamato e GMP-PNP.	- <i>in vitro</i> , $CI_{50}=216 \mu M$ no receptor de glutamato e, $CI_{50} = 396 \mu M$ no GMP-PNP (análogo do GTP)-	Martini et al., 2000
<b>Galangina (GL)</b>	-inibidor da aromatase	- $95 \pm 28 \mu M$ , <i>in vitro</i> .	Kao et al., 1998
<b>5,7-dihidroxi-flavona (5,7-DH)</b>	-moderada ação estrogênica em receptores ER $\beta$	- $10^{-4}$ - $10^{-6}$ M, <i>in vitro</i> .	Choi et al., 2008
<b>5,7-DH</b>	-tipo-ansiolítico	-1 mg/kg i.p. (10% DMSO) em camundongos, no labirinto em cruz elevado	Ognibene et al., 2008
<b>5,7-DH</b>	-tipo-ansiolítico	-2 mg/kg i.p. (4% DMSO) em ratos no labirinto em cruz elevado	Brown et al., 2007
<b>5,7-DH</b>	-ação estrogênica fraca -não antioxidante ou anti- $\beta$ -amiloide	-0,1 - 50 $\mu M$ , <i>in vitro</i> -ensaios com cel. MCF 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzida por espécies reativas de oxigênio, cultura de células PC 12	Zhu et al., 2007
<b>5,7-DH</b>	-interage com transportadores celulares	-50 $\mu M$ , <i>in vitro</i> , no teste do transporte mediado por MCT1 (monocarboxilato)	Wang et al., 2007
<b>5,7-DH</b>	-fraco inibidor da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase II	- <i>in vitro</i> , $CI_{50}=10^{-4}$ – $10^{-5}$ M	Ohno et al., 2004
<b>5,7-DH</b>	-inibe as correntes iônicas	-30 $\mu M$	Goutman et al., 2003

	mediadas por receptores $\rho_1$ GABA <sub>C</sub> e $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s}$ GABA <sub>A</sub>		
<b>5,7-DH</b>	-sedativo (não no sono barbitúrico) -ansiolítico via GABA <sub>A</sub>	-12,5, 25*, 50*, 100* mg/kg i.p. (100% DMSO), em ratos, nos testes do labirinto em cruz, campo aberto e sono barbitúrico	Zanoli et al., 2000
<b>5,7-DH</b>	-inibidor da aromatase	- $K_i = 2.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$	Kao et al., 1998
<b>5,7-DH</b>	-antiestrogênica	- <i>in vitro</i> , se liga ao receptor de estrógeno humano com $\text{CI}_{50} = 33 \mu\text{M}$ -inibe estradiol no ensaio da $\beta$ -galactosidase com $\text{CI}_{50} = 10 \mu\text{M}$	Collins et al., 1997
<b>5,7-DH</b>	-sem efeito sobre a memória	-10 mg/kg i.p. (40% DMSO), em ratos, nos testes do campo aberto, step-down, tail-flick.	Salgueiro et al., 1997
<b>5,7-DH</b>	-tipo-ansiolítico -não sedativo -agonista parcial do sítio BDZ	-0,6-30 mg/kg -1* mg/kg no labirinto em cruz e 3* no rotarod, em camundongos. Sem efeito no teste do arame	Wolfman et al., 1994
<b>5,7-DH</b>	-anticonvulsivante prevenida pelo flumazenil -agonista BDZ-R -miorelaxante	-via i.c.v. em camundongos - <i>in vitro</i> , $K_i$ de ligação ao BDZ-R = $3 \mu\text{M}$ -teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol	Medina et al., 1990 (abstract)
<b>6-hidroxi-flavona (6-H)</b>	-ansiolítico bloqueado pelo FMZ (1,25 mg/kg, i.p.) -não sedativo, não anticonvulsivante -ativa correntes em GABA <sub>A</sub>	-6, 12*, 25*, 50, 100 mg/kg, v.o., em camundongos no labirinto em cruz; -sem efeito no teste da placa perfurada, convulsões induzidas por PTZ, rota-rod, esquiiva passiva ou teste do arame	Ren et al., 2010

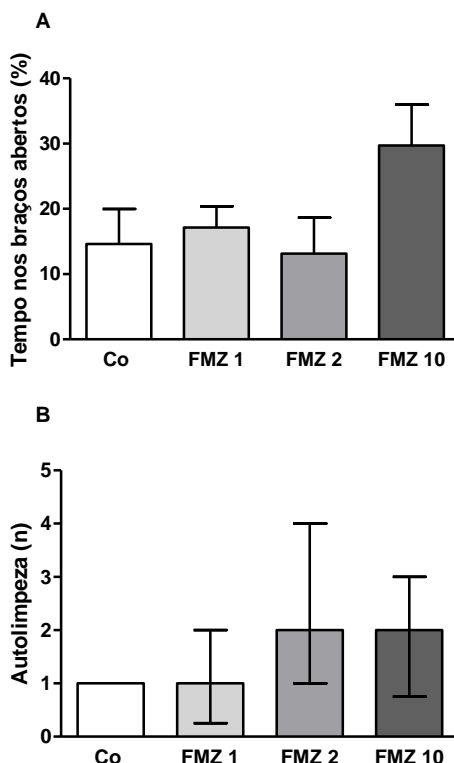
	-afinidade por subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$	- <i>in vitro</i> , $K_i$ de ligação ao BDZ-R = 1,53 $\mu\text{M}$	
<b>6-H</b>	-ligante GABA <sub>A</sub>	- $K_i = 0,580 \mu\text{M}$	Ai et al., 1997
<b>6-H</b>	-forte inibidor da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide II desidrogenase	- <i>in vitro</i> , $\text{CI}_{50} = 5,58 \times 10^{-7} \text{ M}$	Ohno et al., 2004
<b>7-hidroxi flavona (7-H)</b>	-discreto inibidor da enzima 3-hidroxiesteroide desidrogenase	- <i>in vitro</i> , $\text{CI}_{50} = 10^{-4} - 10^{-5} \text{ M}$	Ohno et al., 2004
<b>7-H</b>	-ligante do GABA <sub>A</sub>	- $K_i = 5,3 \mu\text{M}$	AI et al., 1997
<b>6,7-dihidroxi flavona (6,7-DH)</b>	-sem atividade estrogênica pelos receptores ER $\alpha$ e ER $\beta$	- <i>in vitro</i> $10^{-4} - 10^{-11} \text{ M}$	Choi et al., 2008
<b>6,7-DH</b>	-antimicrobiana, intensifica a susceptibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> a meticilina e $\beta$ -lactâmicos	-25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ , <i>in vitro</i>	Sato et al., 2004
<b>6-metoxi flavona (6-M)</b>	-discreto inibidor da enzima 3-hidroxiesteroide desidrogenase	- <i>in vitro</i> , $\text{CI}_{50} = 10^{-4} - 10^{-5} \text{ M}$	Ohno et al., 2004
<b>6-M</b>	-ligante GABA <sub>A</sub> , antagonista ou fraco agonista parcial	- <i>in vitro</i> , $K_i = 0,860 \mu\text{M}$ -correntes de Cl induzidas por GABA	Ai et al., 1997
<b>7,8-dihidroxi flavona (7,8-DH)</b>	-efeito protetor de apoptose induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , de toxicidade em modelo animal da doença de Parkinson e	- <i>in vitro</i> , 35-500 nM - <i>in vivo</i> , 5 mg/kg, v.o., em camundongos	Jang et al., 2010

	toxicidade induzida por ácido kaínico		
<b>7,8-DH</b>	-efeito protetor contra estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio	- <i>in vitro</i> , 0,1-10 µg/ml, nos danos celulares induzidos por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -ativação da proteína Kinase B	Zhang et al., 2009
<b>7,8-DH</b>	-inibidor da aromatase	-10 ± 1 µM, <i>in vitro</i> .	Kao et al., 1998

\* = Doses que apresentaram resultados significativos em qualquer dos testes apresentados, quando as demais doses testadas no trabalho não apresentaram efeito em nenhum dos testes. BDZ=benzodiazepínico; FMZ=flumazenil

## APÊNDICE B

## CURVA DOSE RESPOSTA DE FMZ NO TESTE DO LCE



**Figura B** – Curva dose-resposta da influência do tratamento com o flumazenil (FMZ) (1, 2 ou 10 mg/kg, i.p.) nos comportamentos: A) tempo nos braços abertos e, B) comportamento de autolimpeza, em camundongos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado, durante 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. ou a mediana dos resultados obtidos e o intervalo interquartil (Q1-Q3). O número de animais usados em cada tratamento variou de 7 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle – Co; ANOVA seguida pelo teste Dunnett ou Kruskal-Wallis seguido do teste das Comparações múltiplas).

## APÊNDICE C

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM FMZ NO  
COMPORTAMENTO INDUZIDO PELO TRATAMENTO COM  
DZP OU BC NO LCE**

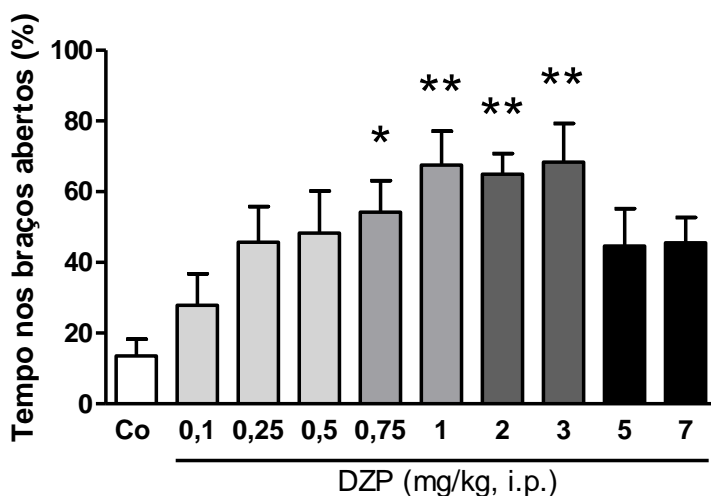
**Tabela C** – Efeito do pré-tratamento com diferentes doses de FMZ no comportamento induzido pelo DZP ou pela BC no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tratamentos		Comportamentos				
i.p. (mg/kg)	i.c.v. (pmol)	N	%EA	%TA	SAP (n°)	HD (n°)
Co	PBS	8	25,8(±5)	14,6(±5,3)	2,2(±0,7)	6,4(±1,5)
FMZ (1)	PBS	8	30,6(±5,3)	17,2(±3,2)	1,8(±0,7)	8,5(±2)
FMZ (2)	PBS	7	24,4(±6)	13(±5)	1(±0,4)	7(±2,2)
FMZ (10)	PBS	10	39,2(±4,7)	29,7(±6,3)	0,8(±0,4)	10,2(±2,2)
Co	DZP	7	51(±10,3)*	56(±12,3)**	0,1(±0,1)*	27,8(±5)**
FMZ (1)	DZP	8	41,8(±10)	36,7(±11,4)	1,1(±0,6)	12,5(±4,2)*
FMZ (2)	DZP	10	40,7(±5,7)	32,5(±8,6)	1(±0,5)	16,2(±6,4)*
FMZ (10)	DZP	8	47,5(±7,7)	52,6(±10)	0,4(±0,37)	13(±4,4)*
Co	PBS	8	25,8(±5)	14,6(±5,3)	2,2(±0,7)	6,4(±1,5)
FMZ (1)	PBS	8	30,6(±5,3)	17,2(±3,2)	1,8(±0,7)	8,5(±2)
FMZ (2)	PBS	7	24,4(±6)	13(±5)	1(±0,4)	7(±2,2)
FMZ (10)	PBS	10	39,2(±4,7)	29,7(±6,3)	0,8(±0,4)	10,2(±2,2)
Co	BC	9	51,8(±6)*	49,6(±8,2)*	0,3(±0,2)*	34(±4,6)**
FMZ (1)	BC	9	60,6(±10)	59(±14,1)	1,1(±0,6)	20(±3,3)**
FMZ (2)	BC	10	51,5(±6,9)	31,4(±11,3)	0,6(±0,2)	9,3(±2,1)**
FMZ (10)	BC	9	51,34(±9,7)	53(±12,4)	0,1(±0,1)	17(±4,6)**

EA% - porcentagem de entradas nos braços abertos, TA% - porcentagem de tempo nos braços abertos, SAP - *stretched-attend postures* ou estiramentos corporais, HD - *head-dipping* ou imersões de cabeça. Co (NaCl 0,9%) ou PBS (DMSO 1% em PBS) foram usados como controle (0,1 ml/10 g, i.p. e 2 µl/i.c.v., respectivamente). FMZ (flumazenil 1, 2 ou 10 mg/kg, i.p.) foi injetado 20 min antes do tratamento. DZP (diazepam - 7 nmol/2 µl, i.c.v.) ou BC (baicaleína - 0,2 pmol/2 µl, i.c.v.) foram comparados com o respectivo grupo controle (Co+PBS x Co+DZP ou Co+BC; e Co+DZP ou Co+BC x FMZ+DZP ou FMZ+BC) por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Duncan. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 quando comparado ao respectivo grupo controle.

## APÊNDICE D

## CURVA DOSE RESPOSTA DE DZP NO TESTE DO LCE



**Figura D** - Curva dose-resposta da influência do tratamento com o diazepam (DZP, mg/kg, i.p.) no tempo nos braços abertos, em camundongos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado, durante 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos + E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou de 8 a 10 animais. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle – Co; ANOVA seguida pelo teste Dunnett).

## **ANEXOS**



## ANEXO A

### FOLHA DE APROVAÇÃO PARA DESENVOLVIMENTO DO PROJETO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
Campus Universitário - CCB/Bloco D  
Trindade - CP 476 - Florianópolis - SC  
88049-900 - Fone (48) 3721 9491 - Fax (48) 3337 5479



#### DECLARAÇÃO

Declaro que os projetos de autoria da Professora Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, foi aprovado em reunião do Colegiado deste departamento em 19/11/2009, como segue: 1º) Influência das condições de alojamento no comportamento e nas vias de sinalização em camundongos; 2º) Avaliação do efeito neuropsicofarmacológico do suco dos frutos de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener em camundongos; 3º) Efeito farmacológico central de flavonóides em camundongos; 4º) Avaliação do papel modulatório da substância p/ Receptores NK1 no modelo de ansiedade experimental de odor do gato; 5º) Atividade neurofarmacológica da casca dos frutos da espécie *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* (maracujá): Uso potencial como Ansiolítico e antidepressivo; 6º) O papel da via serotoninérgica ascendente do núcleo dorsal da raia na ansiedade experimental de ratos modulada pelo sistema N/OFG-receptor NOP.

Florianópolis, 20 de novembro de 2008.

  
Prof. Dr. Tadeu Lemos  
Departamento de Farmacologia  
CCB/UFSC